



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO

**Estudio de la infección natural por *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* en bovinos nacidos en rodeos con
paratuberculosis**

AUTOR: Moyano Roberto Damián

DIRECTORES

Dra. María Isabel Romano, Instituto de Biotecnología INTA Castelar

Dr. Travería Gabriel Eduardo, CEDIVE-FCV-UNLP

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Biotecnología, INTA Castelar

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. Silvia L. Mundo

Dra. Magdalena Rambeaud

Dr. Angel Cataldi

2017.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria Isabel Romano y el Dr. Gabriel Travería, porque aportaron toda su dedicación para realizar la presente tesis, además de todos sus conocimientos.

A los compañeros del laboratorio Lau, Ale, Marian, Xime, Belen, Paz y Nata, por estar siempre.

A toda la gente del Instituto de Biotecnología de INTA con quienes comparto todos los días laborales y lo hacen muy ameno.

A los chicos del CEDIVE (Luisito, Fio, Popo, Magui) los cuales fueron de gran ayuda en los muestreos realizados.

A Fede y Majo por enseñarme y ayudarme con gran parte de los ensayos con células.

A la Dra. Barbará Fernandez, y equipo de la UBA, por sus colaboraciones.

A la Dra. Mariana Piuri y la Lic. Estefani Urdaniz, por su colaboración con los micobacteriófagos.

A mis padres que siempre están acompañándome en todo lo que emprendo.

A mi madrina que siempre está presente.

A toda la gente que conocí en estos años de vida de formación con los cuales compartí muy buenos momentos y que ya son parte de mi familia.

A todos mis amigos que siempre están cuando uno necesita algo.

Y además es importante destacar que todo esto fue gracias al Estado Nacional, UNLP donde realicé mi formación, CONICET quien me otorgo la beca para poder realizar el doctorado y a la Agencia de Ciencia y Tecnología que aportó los fondos para los proyectos realizados.

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1	4
INTRODUCCIÓN	4
GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD	5
CLASIFICACIÓN	6
SUPERFICIE CELULAR	8
COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC)	10
MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS	11
SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS)	13
IS900	14
REPETICIONES EN TÁNDEM DE NÚMERO VARIABLE (VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS, VNTR)	15
DIVERSIDAD DE LAS CEPAS DE MAP	18
ENFERMEDAD DE JOHNE O PARATUBERCULOSIS	21
ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD	23
PREVALENCIA EN ARGENTINA Y AMÉRICA LATINA.	25
DIAGNÓSTICO DE MAP	26
DIAGNÓSTICO DIRECTO	26
DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO.	27
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE	27
EXAMINACIÓN DIRECTA.	28
CULTIVO	29
DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MICOBACTERIOFAGOS	31
PRUEBAS MOLECULARES: PCR, PCR EN TIEMPO REAL	32
DIAGNÓSTICO INDIRECTO	35
TEST DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (COMPLEMENT FIXATION TEST, CFT).	35

INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (AGAR-GEL IMMUNODIFFUSION, AGID).	35
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA).	36
ENSAYO DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CÉLULAS	36
PRUEBA DEL GAMMA INTERFERÓN.	37
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY, DTH).	38
GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE BOVINA FRENTE AL PATÓGENO	39
POBLACIONES LINFOCITARIAS	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	47
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
CAPÍTULO 2	50
MATERIALES Y MÉTODOS	50
RODEOS BOVINOS ENSAYADOS	51
MUESTRAS RECOLECTADAS DE LOS BOVINOS ENSAYADOS	52
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE BOVINOS	53
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL	53
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE.	53
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS REALIZADAS A LOS ANIMALES EN ESTUDIO	53
TEST DE TUBERCULINA-INTRADERMOREACCIÓN	54
ENSAYO DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)	55
TEST DE RESPUESTA HUMORAL-ELISA ANTÍGENO PPA-3	56
TEST DE RESPUESTA HUMORAL-ELISA UTILIZANDO EL ANTÍGENO WA	57
ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS DE IGG.	59
TINCIÓN DIRECTA.	60

CULTIVO DE MAP A PARTIR DE MATERIA FECAL.	61
MEDIOS DE CULTIVO	63
EXTRACCIÓN DE ADN DE LECHE	65
EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIA FECAL	65
DETECCIÓN DE MAP MEDIANTE PCR IS900 EN TIEMPO FINAL.	66
CUANTIFICACIÓN DE MAP MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	68
DETECCIÓN DE MAP VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MICOBACTERIÓFAGOS	70
ENSAYOS PARA ESTUDIOS DE PERFILES INMUNOLÓGICOS	72
EVALUACIÓN DE PERFILES DE CITOQUINAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.	72
PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.	72
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.	72
SÍNTESIS DE ADN COPIA	73
PCR EN TIEMPO REAL.	74
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EVALUAR POBLACIONES LINFOCITARIAS.	76
GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE MAP MEDIANTE MIRU-VNTR	78
PODER DE DISCRIMINACIÓN	79
CAPÍTULO 3	81
RESULTADOS	81
PRIMERA PARTE	82
EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LOS ANIMALES DE LOS RODEOS EN ESTUDIO	82
RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO DE MADRES PERTENECIENTES A LOS RODEOS EN ESTUDIO	83
RODEO DE BAJA PREVALENCIA	83
RODEO DE ALTA PREVALENCIA	84
DETECCION DE MAP EN TANQUES DE LECHE	87

RESULTADOS DE DIAGNÓSTICOS DE TERNEROS PERTENECIENTES A LOS RODEOS EN ESTUDIO.	87
RESPUESTA CELULAR	87
LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA MEDIANTE ELISA.	87
RESPUESTA AL ENSAYO DE INTRADERMOREACCIÓN CON PPDA	89
RESPUESTA HUMORAL	91
CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IGG TOTALES MEDIANTE ELISA	91
CUANTIFICACIÓN DE ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE ELISA CON EL ANTÍGENO PPA-3.	93
DIAGNÓSTICO DIRECTO	95
DIAGNÓSTICO MEDIANTE CULTIVO DE MATERIA FECAL.	95
DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR/PCR EN TIEMPO REAL.	96
DIAGNÓSTICO DIRECTO MEDIANTE TINCION DE Ziehl-Neelsen	97
DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE FAGOS	98
EVALUACIÓN DEL ESTADO GENERAL DE LOS ANIMALES Y SINTOMATOLOGÍA DE LOS RODEOS EN SEGUIMIENTO	100
RESULTADOS DEL ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO EN RAP Y RBP.	100
DISCUSIÓN PRIMERA PARTE	105
SEGUNDA PARTE	112
RESPUESTA INMUNE	112
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T EN LOS DIFERENTES RODEOS	113
POBLACIONES LINFOCITARIAS T ACTIVAS (CD25 ⁺) EN LOS DIFERENTES RODEOS	117
POBLACIONES LINFOCITARIAS B EN LOS DIFERENTES RODEOS	123
EXPRESIÓN DE CITOQUINAS	125
DISCUSIÓN SEGUNDA PARTE	131
TERCERA PARTE	138
GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE MAP MEDIANTE MIRU-	138

VNTR	
DISCUSIÓN TERCER PARTE	145
CONCLUSIONES	148
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES RELACIONADAS AL TRABAJO DE TESIS

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS

IMPERIALE, BR^{*}, MOYANO, RD^{*}, DI GIULIO, AB, ROMERO, MA, ALVARADO PINEDO, MF, SANTANGELO, MP, TRAVERÍA, GE, MORCILLO, NS, ROMANO, MI. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. Epidemiology and infection. Aceptado 07 de enero 2017. Publicado 10 de febrero de 2017.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS.

MOYANO R. D.; ROMERO MA; ALVARADO PINEDO, F.; GRAVISACO M. J.; SANTANGELO, P.; TRAVERIA G.; ROMANO, M. Evaluation of the cellular immune response in naturally infected cattle with *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* from Argentina. Francia. Nantes. 2016. Congreso. 13th International Colloquium on Paratuberculosis. l'International Association for Paratuberculosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido deoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AFLP: Polimorfismos de fragmentos largos

Ag: Antígeno

AGID: Inmunodifusión en gel de agarosa

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr 16s: Ácido ribonucleico ribosómico subunidad 16s.

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

BSA: Albúmina sérica bovina

C: Citosina

CFT: Test de fijación del complemento

CPA: Células presentadoras de antígenos

Ct: Temperatura de melting/fusión

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

DNTPs: Dinucleótidos trifostato

DO: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

G: Guanina

HEYM: Medio de Herrold con yema de huevo

HGDI: Índice de discriminación de Hunter y Gaston

HPC: Hexadecil piridinio.

HRM: Curvas de disociación de alta resolución

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IS: Secuencia de inserción

kbp: (kilo) pares de bases

LAM: Lipoarabinomano

LJ: Medio Löwenstein-Jensen

LSP: Fragmentos polimórficos largos

MA: Ácidos micólicos

Maa: *Mycobacterium avium* subespecie *avium*

MAC: Complejo *Mycobacterium avium*

Mah: *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis*

Map: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

MIRU: Unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias

MLN: Linfocitos derivados de linfonódulo mesentérico

MLVA: Análisis de repeticiones-tandem de número variable de múltiples locus

ORF: Marco de lectura abierto

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos microbianos.

pb: Pares de base

PBMC: Células mononucleares derivadas de sangre periférica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Prolina-Ácido glutámico

PFGE: Electroforesis en campo pulsado

PG: Péptido glicano

PPDA: Derivado proteico de *Mycobacterium avium*

PPDB: Derivado proteico de *Mycobacterium bovis*

PPE: Prolina-Prolina-Ácido Glutámico

qPCR: PCR cuantitativa

RAP: Rodeo con alta prevalencia de paratuberculosis

RBP: Rodeo con baja prevalencia de paratuberculosis

RDA: Análisis diferencial representacional

RFLP: Restricción de fragmentos polimórficos largos

RN: Rodeo negativo.

SARS: Síndrome respiratorio agudo y grave.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

SSC: Citrato de sodio-citrato de cloro

SSR: Repeticiones de secuencia corta

TLR: Receptores tipo Toll

T_m: Temperatura de disociación

TNF: Factor de necrosis tumoral

TR: Repeticiones en tándem

UFC: Unidades formadoras de colonias

UFP: Unidades formadoras de placa

VNTR: Repeticiones en tándem de número variable

WA: Extracto total de avium

ZN: Ziehl-Neelsen

RESUMEN

A) TITULO: Estudio de la infección natural por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos nacidos en rodeos con paratuberculosis

B) PALABRAS CLAVE: Paratuberculosis, diagnóstico, bovinos jóvenes, respuesta inmune.

C) RESUMEN

En la presente tesis se estudió la evolución de la paratuberculosis bovina en terneros nacidos en establecimientos con presencia de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de marcadores de protección y/o enfermedad que permitan el diagnóstico temprano de la paratuberculosis bovina. Con este propósito se estudiaron animales nacidos de dos rodeos lecheros con una prevalencia real de 30% y 10%, y un rodeo negativo.

En base a los resultados obtenidos pudimos detectar la presencia de anticuerpos específicos de forma temprana en los rodeos infectados. En el rodeo de alta prevalencia se observan anticuerpos a los 8-10 meses de edad y en el rodeo de baja prevalencia a los 16 meses, mientras que la producción de interferón gamma en sangre periférica se detecta a los 18 meses solamente en el rodeo de alta prevalencia.

Junto con la presencia de anticuerpos IgG totales en los dos rodeos en animales jóvenes, se destacó la presencia del isotipo IgG2 en animales con diagnóstico positivo a la enfermedad a los 18 meses de edad. Los animales que presentaron títulos altos en serología presentaron mayores niveles de linfocitos T WC1⁺ activados (CD25⁺). Por último, se pudo observar que las citoquinas que presentaron mayores niveles de expresión pertenecieron tanto a una respuesta inmune del tipo Th1, Th17 y Th2 lo cual sugeriría que la paratuberculosis bovina desarrolla una respuesta inmunológica que involucra a las 3 respuestas.

Se realizó también la genotipificación de aislamientos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de los establecimientos en estudio y otros provenientes de la provincia de Buenos Aires. Los resultados obtenidos destacaron la presencia de 5 genotipos diferentes los cuales ya habían sido reportados en Argentina.

D) TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS: Study of natural infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle born in herds with paratuberculosis

E) PALABRAS CLAVES EN IDIOMA INGLÉS: paratuberculosis, diagnostic, young animals, immune response

F) RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS

In this thesis, we studied the evolution of the bovine paratuberculosis in calves born in herds with the presence of the disease. The aim of this work was the study of protection and/or disease markers that allow early diagnosis of bovine paratuberculosis. For this purpose we studied animals from two dairy herds with a real prevalence of 30% and 10%, and a negative herd.

Based on the results obtained we could detect the presence of early specific antibodies in infected herds at the age of 8-10 months in the high prevalence herd and at the age of 16 months in the low prevalence herd. On the other hand, the detection of interferon gamma was detected at the age of 18 months in peripherally blood in the high prevalence herd.

Together with the presence of total IgG antibodies in young animals from two rodeos, the presence of the isotype IgG2 was highlighted in animals with positive diagnosis to the disease at the age of 18 months. Animals which had high titers in serology showed higher levels of WC1⁺ T activated cells (CD25⁺). Finally, it was observed that cytokines that showed higher levels of expression belonged to Th1, Th17 and Th2 type immune response which would suggest that the bovine

paratuberculosis develops an immune response with the participation of the 3 responses.

By last, It was also performed the genotyping of isolates of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* from herds on study and others from the province of Buenos Aires. The results highlighted the presence of 5 different genotypes which had already been reported in Argentina.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se enumerarán las características generales de la enfermedad de Johne o Paratuberculosis y de su agente causal, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, indicando las características generales, los diferentes tipos genéticos de Map, el diagnóstico actual de la enfermedad y los datos más relevantes de la interacción patógeno-hospedador.

GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es una enfermedad crónica, producida por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) que afecta a numerosas especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres. Las principales especies afectadas son bovinos, ovinos, caprinos, cérvidos y bubalinos. También se ha descrito en otras especies como caballos, cerdos, mulas, perros, pollos y primates, incluso en humanos (Council 2003) asociado con la enfermedad de Crohn. Esta enfermedad ocasiona una ileocolitis granulomatosa crónica con compromiso de los ganglios y vasos linfáticos asociados (Thayer y col. 1984). En los bovinos se caracteriza por afectar la producción láctea y cárnica, debido a que produce mala condición corporal y diarreas intermitentes. Actualmente la enfermedad no posee tratamiento y en la etapa final de la enfermedad, con diarreas continuas, los animales mueren en un lapso corto de tiempo. En las fases finales de la enfermedad se observa la formación de edema submandibular muy característico. Se distingue de otras enfermedades ya que no presenta signos clínicos en etapas iniciales de la infección, por esta razón los animales infectados conservan la actividad productiva al comienzo de la misma (Clarke 1994). Por otro lado se diferencia de otras infecciones bacterianas que producen diarrea en que la paratuberculosis no cesa con el tratamiento con antibiótico. Esta enfermedad tiene distribución mundial, fue descrita por primera vez en Alemania en 1895 por Johne y Frothingham (Valentin-Weigand & Goethe 1999), mientras que en América fue descrita por primera vez en 1915 en Brasil (Dupont

1915). Luego en 1932 Rosenbusch describe la presencia de paratuberculosis por primera vez en la Argentina (Rosenbusch 1937).

CLASIFICACIÓN

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Son bacilos cortos, aerobios, no móviles (la movilidad es poco frecuente, se limita a algunos grupos y se produce por flagelos), de vida intracelular facultativa, no forman esporas, no son encapsulados (Rastogi y col. 2001). Una propiedad distintiva del género radica en la tinción de Ziehl-Neelsen; estos bacilos se tiñen con dificultad con fucsina, pero una vez que toman el colorante, resisten la decoloración con alcohol ácido debido a la compleja pared celular de alto contenido lipídico que poseen. Por esta razón se los denomina bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR).

Actualmente, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de contenido de GC en su genoma (Vincent Levy-Frebault & Portaels 1992).

Debido a las propiedades y características físico-químicas de la pared celular, las micobacterias poseen gran capacidad de resistencia al desecamiento, a la alcalinidad, a ambientes con pocos nutrientes y a los cambios de temperatura. En el proceso de interacción de la micobacteria con el medio circundante, la pared y sus componentes cumplen un rol importante, así como en el vínculo patógeno-hospedador.

Las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* también se clasifican en función de otras características como el tiempo requerido para la formación de colonias visibles en medio sólido. Así, los miembros del género se clasifican comúnmente en dos grandes grupos: micobacterias de “crecimiento rápido” y de “crecimiento lento”. En el caso de las primeras, la aparición de colonias visibles se

produce en un período inferior a siete días y en el caso de las segundas mayor a siete días.

Actualmente debido a los avances en biología molecular, existe una clasificación basada en genes diana, el comúnmente empleado es el gen del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) (Figura 1), caracterizado por tener una longitud aproximada de 1500 nucleótidos y presentar en su secuencia regiones altamente conservadas y otras regiones hipervariables en las especies de micobacterias (Boddinghaus y col. 1990).

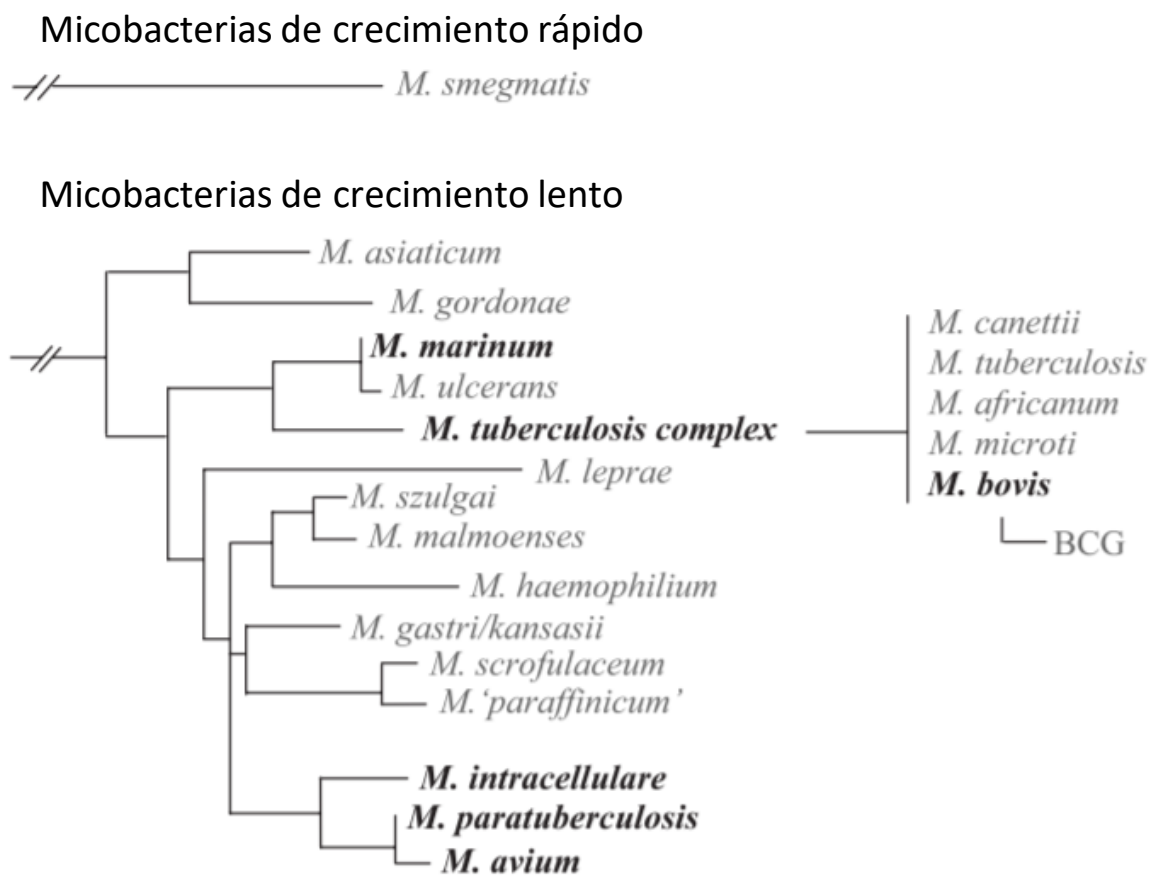


Figura 1: Árbol filogenético de micobacterias basado en la secuencia del ARNr 16s (Biet y col. 2005).

SUPERFICIE CELULAR

Se puede observar que las micobacterias cuando crecen en ciertos medios sólidos, suelen formar colonias apretadas, compactas y rugosas, en vez de estar esparcidas uniformemente por la superficie del agar. Esta disposición probablemente se debe al gran contenido de lípidos y a la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular. Dicha superficie celular está compuesta principalmente por tres estructuras complejas: la membrana citoplasmática; la pared celular, que contiene peptidoglicano (PG) covalentemente unido a arabinogalactano (un polisacárido altamente ramificado), el que a su vez se une a ácidos micólicos y a una capa lipídica externa compuesta por numerosos lípidos complejos; por último, en el lado externo, una capa formada por polisacáridos, proteínas y lípidos (Prinzis y col. 1993; Brennan & Nikaido 1995). Si bien es considerada una bacteria Gram (+), la compleja estructura de su pared posee características tanto de bacterias Gram (+) como Gram (–) y algunas otras que son propias y únicas de las micobacterias. Minnikin en 1982 fue el primero en proponer un modelo para el arreglo de las tres macromoléculas covalentemente unidas (es decir, peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos) y algunos de los lípidos asociados a la pared. En este modelo, los ácidos micólicos forman una monocapa cerca de la superficie externa de la pared con las cadenas acilo de varios lípidos asociados a la pared intercaladas con las cadenas de micolato. Este modelo original implica la existencia de una segunda capa hidrofóbica, impermeable a las moléculas polares. De hecho, Hoffmann y colaboradores estudiaron criosecciones ultrafinas de *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG e identificaron una bicapa lipídica externa morfológicamente simétrica, la cual es análoga a la membrana externa de las bacterias Gram (–) (Hoffmann y col. 2008). Esta propiedad explicaría la tendencia de las micobacterias a producir un crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la resistencia ácido-alcohol (Malaga y col. 2008).

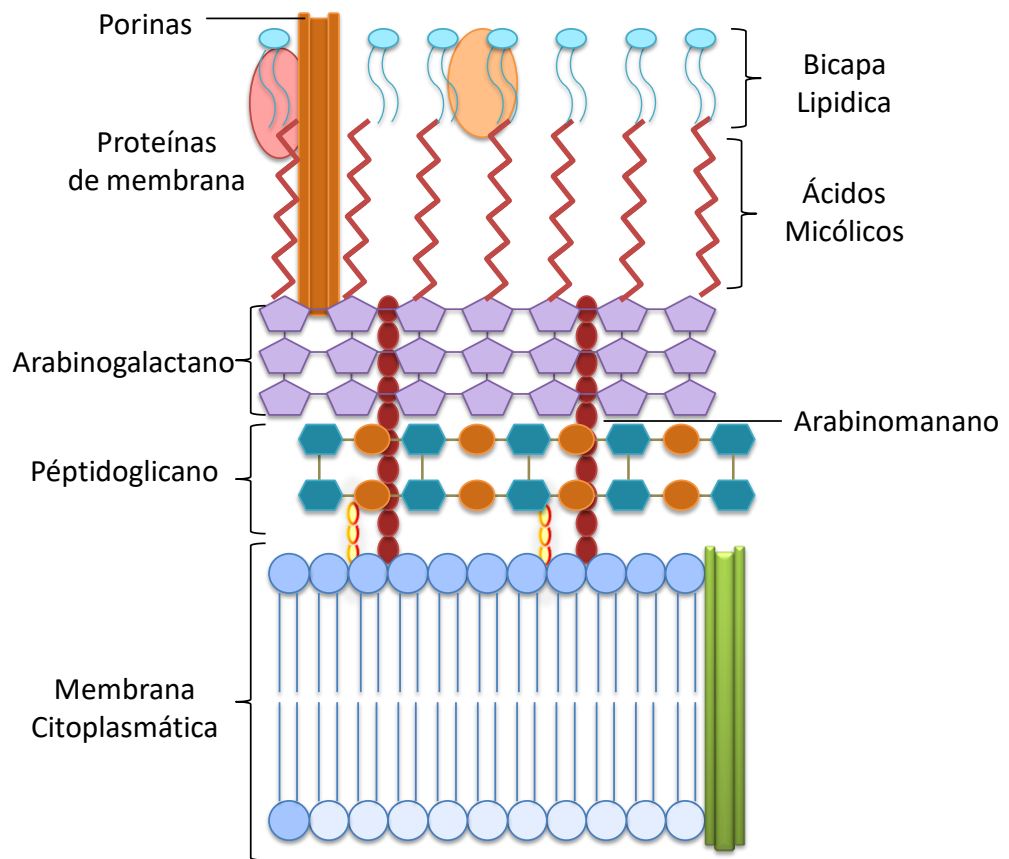


Figura 2: Esquema de la estructura de la pared celular de las micobacterias.

Todas estas características de la pared celular bacteriana son distintivas y únicas de las micobacterias con respecto del resto de las bacterias. Sin embargo, aunque las micobacterias poseen una capa gruesa de PG y carecen de una membrana externa al igual que las bacterias Gram positivas, también presentan propiedades similares a las bacterias Gram negativas. Entre ellas, no es posible la tinción de Gram (sin embargo retienen la carbol fucsina aún en presencia de ácido y alcohol) debido a la presencia de porinas (Figura 2) en esta membrana lipídica externa, además de presentar un espacio en el mismo que podría funcionar de manera semejante al periplasma en las bacterias Gram negativas (Hett & Rubin 2008).

COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC)

MAC comprende dos especies estrechamente relacionadas, *M. intracellulare* y *M. avium*. Esta última consta de cuatro subespecies: *M. avium* subsp. *avium* (Maa), *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mah) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), cada una infecta a huéspedes específicos. Entre estas subespecies, Mah, ha sido principalmente aislado de fuentes ambientales, de humanos y cerdos. Los análisis llevados a cabo en Europa utilizando métodos de genotipificación molecular mostraron alta similitud genética entre las cepas del complejo MAC aisladas de humanos y cerdos (Tirkkonen y col. 2010; Nicolas Radomski y col. 2010). Estos resultados indican la posibilidad de que haya una fuente común de infección. Maa se conoce como el agente causal de la tuberculosis aviar que afecta a diferentes especies animales en todo el mundo, como cerdos, ganado, especialmente aves que se consideran los principales reservorios de este organismo (Moravkova y col. 2013).

Dada la variabilidad natural entre organismos de MAC, es más seguro considerarlos como un microcosmos del género micobacteriano que incluye tanto micobacterias ambientales como patógenos anfitrión-asociados con sus propias identidades genómicas (Primm y col. 2004; Larsen y col. 1956; Whittington y col. 2004).

Los miembros de este complejo MAC presentan unas características tanto genéticas como fenotípicas particulares, las cuales les permiten el crecimiento en biotipos naturales sin perder por ello su potencial patógeno. Entre estas características se destacan el amplio rango de temperaturas dentro del cual son capaces de crecer (desde 20°C hasta 37°C), la capacidad de adaptación a nuevos sustratos con amplios rangos de pH, desde 4 a 7,5 (pH óptimo comprendido entre 5,4 y 6,5) (Portaels y col. 1982). A su vez, todos los miembros de MAC se destacan por ser ácido-alcohol resistentes, presentar un crecimiento lento y producir un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied y col. 1993).

Las especies de micobacterias de este complejo son patogénicas para un

rango amplio de especies (humano, animales domésticos y salvajes). Estos diferentes reservorios han sido documentados en Argentina en infecciones originadas por Maa y Map (Uhart y col. 2003; Paolicchi y col. 2001; Bernardelli y col. 2002). En el caso de los humanos se destaca Mah, patógeno oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En el caso de los pacientes con SIDA, se ha descrito que la frecuencia de infecciones concomitantes por miembros de MAC oscila entre el 25 y el 50% (Horsburgh y col. 2001; Nightingale y col. 1992; Imperiale y col. 2012).

A su vez, los miembros de MAC han sido aislados fuera de hospedadores, en el medioambiente y en una amplia variedad de biotipos, entre los que se incluyen el suelo, tanques de almacenaje de agua, agua de desecho, agua municipal, aerosoles, protozoos, etc. (Biet y col. 2005). También en los últimos años se encontró en tejido vegetal (Kaevska y col. 2014).

MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS

M. avium subsp. *paratuberculosis* (Map) es un microorganismo ácido-alcohol resistente (lo cual se refleja en la presencia de una coloración roja en las tinciones de Ziehl-Neelsen) y su tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm . Una de sus principales características es que no genera micobactina (Cocito y col. 1994), moléculas lipídicas de alto peso molecular quelante de hierro. Fenotípicamente se caracteriza por un crecimiento lento y por su requerimiento de micobactina en el medio de cultivo y la formación de colonias rugosas no pigmentadas, siendo necesario para visualizar las colonias primarias de Map en medio sólido entre 5 semanas y 6 meses. Las cepas derivadas de ovejas, incluidos los tipos infrecuentes con pigmentación amarilla brillante, son más difícil de aislar en cultivo que las del ganado bovino y los cultivos primarios no deben desecharse como negativos si no es tras una incubación prolongada. Los medios utilizados para el cultivo de Map son principalmente Herrold (HEYM) o Löwenstein-Jensen (LJ), También se utilizan medios sintéticos como el Middlebrook 7H10, medio sólido y el medio líquido BACTEC™ 12B, todos los medios

son suplementados con yema de huevo y micobactina, estos últimos medios son excelentes para el cultivo de las cepas ovinas de Map (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016).

La denominación actual de Map (Thorel y col. 1997) sufrió diferentes modificaciones desde su inicial descripción como *Mycobacterium enteritidis*; *Pseudotuberculosis*; *Bacterium paratuberculosis*; *Bacillus paratuberculosis* y más tardíamente *Mycobacterium johnei*.

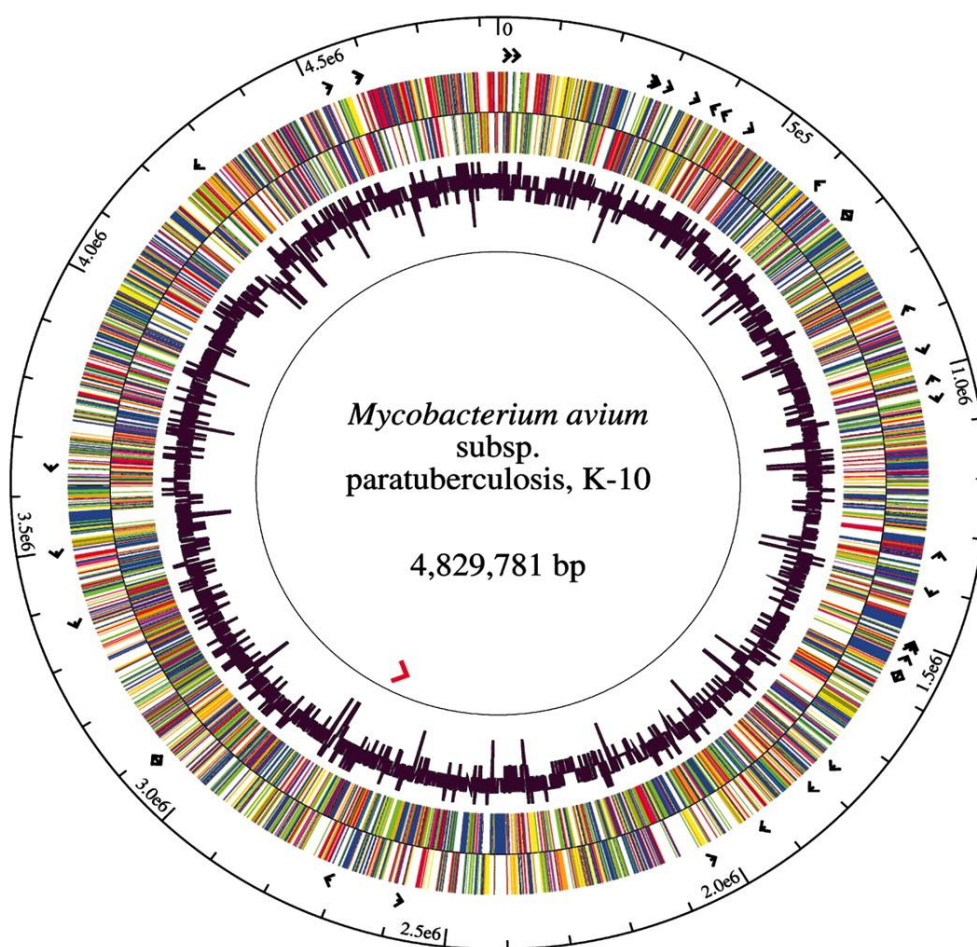


Figura 3: Representación circular del genoma de Map-K10 cepa de referencia (Li y col. 2005).

Tras su caracterización y reconocimiento como parte del género *Mycobacterium*, recibió el nombre de *Mycobacterium paratuberculosis*, por el cual se conoce a la enfermedad como paratuberculosis. Ya en 1990, y debido a las similitudes genéticas y antigénicas encontradas entre este agente y *Mycobacterium avium*, se propuso considerar a *M. paratuberculosis* como una subespecie de *M.*

avium y denominarla *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Cocito y col. 1994; Clarke 1997; Chiodini y col. 2011).

En el año 2005 se finalizó la secuenciación del genoma de Map K-10, cepa de referencia, obtenida a partir de un aislamiento bovino (Figura 3) (Li y col. 2005). Posee un contenido de GC del 69.3% y su genoma está compuesto por 4.829.781 pares de bases que codifican para 4350 marco de lectura abiertos (ORF) (Li y col. 2005). Aproximadamente 1.5% del genoma de Map corresponde a secuencias de inserción, familias de multigenes y genes duplicados. Se identificaron 17 copias de la secuencia de inserción IS900, específica de Map.

Las diferencias básicas en los genes de Map en comparación con otras micobacterias se deben principalmente a genes responsables del metabolismo de lípidos; genes pertenecientes a la familia PE/PPE, secuencias de inserción y proteínas hipotéticas (Marri y col. 2006).

SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS)

Dentro de los genomas bacterianos podemos encontrar diferentes formas de ADN repetidos, uno corresponde a secuencias en tándem y otras a repeticiones dispersas dentro del genoma. Estas secuencias corresponden a genes duplicados o elementos móviles presentes en múltiples copias. Un ejemplo de ello son las secuencias de inserción (IS). Estos elementos al tener movilidad brindan una gran plasticidad al genoma pudiendo generar alteraciones del mismo.

En el genoma de Map se encuentran varias secuencias repetitivas, dentro de ellas una que tuvo gran valor debido a que es una secuencia específica de Map, es la secuencia de inserción IS900, la cual se encuentra en 17 copias en el genoma de referencia de Map K10. Otras secuencias ampliamente utilizadas para caracterizar aislamientos del MAC son IS1311, ISMav2 (Stratmann y col. 2002); f57 (Vansnick y col. 2004) o el locus 255 (Bannantine y col. 2002), entre otras. Además se pudo saber que estas secuencias de inserción se localizan en regiones intergénicas, lo cual no produce alteraciones en los genes esenciales (Li y col. 2005).

IS900

Dentro de todas las IS definidas dentro del género *Mycobacterium*, IS900 fue la primera descrita e identificada. La secuencia consta de 1451 pb distribuida en un total de 15-20 copias en el genoma de Map (McFadden y col. 1987; Green y col. 1989). El contenido en GC de la IS y de la región adyacente es del 66% y además presenta un ORF de 1197 pb (localizado entre los nucleótidos 236 y 1432) que codifica para una transposasa hipotética de 399 aminoácidos en una cadena, denominada p43 (Tizard y col. 1992) y una proteína de función desconocida en la otra, Hed (Doran y col. 1994). IS900 se inserta en una dirección dentro de una región consenso en un loci altamente conservados en el genoma de Map (Bull y col. 2000).

Las secuencias adyacentes a IS900 no contienen repeticiones directas ni invertidas, por lo que se ha descrito en la literatura que esta IS puede haber tenido su origen en un micobacteriófago, ya que en la mayoría de las IS se ha descrito la movilidad de los mismos porque contiene los genes necesarios para el proceso de inserción de un segmento del ADN en el cromosoma y para la movilización de dicho segmento a una localización diferente (Green y col. 1989).

La presencia o ausencia de las IS han servido para la subtipificación de los miembros de MAC (Bartos y col. 2006) y en particular IS900 se ha empleado como secuencia diana en el diagnóstico e identificación de Map (Turenne y col. 2008). Sin embargo se han encontrado secuencias similares a IS900 en otras especies (Englund y col. 2002). El empleo de esta IS como diana para la detección de Map se ha llevado a cabo a través de diferentes técnicas moleculares rápidas como PCR con oligonucleótidos dirigidos a la secuencia, también empleando para la PCR oligonucleótidos hibridados a un fluorocromo (Rowbotham y col. 1995), PCR múltiple (Al-Shamali y col. 1997; Bull y col. 2000; Irenge y col. 2009), PCR anidada (Möbius, Hotzel, y col. 2008), PCR-*in situ* en tejidos de origen ovino (Sanna y col. 2000), PCR en tiempo real empleando en algunos casos sondas fluorescentes (Fang y col. 2002;

Englund y col. 2001), PCR dirigida a las regiones flanqueantes del elemento IS900 (Collins y col. 1997), análisis de *fingerprint* utilizando las localizaciones genómicas de integración del IS900 (Ozbek y col. 2003), separación inmunomagnética antes de la PCR dirigida a la secuencia IS900 (Djønne y col. 2003). Por último, esta IS también se ha empleado como sonda para la genotipificación de Map utilizando técnicas moleculares tradicionales para epidemiología molecular como la restricción de fragmentos polimórficos largos (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), en la cual luego de la separación de los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción se realiza una hibridación a la secuencia IS900 (IS900-RFLP) (Bauerfeind y col. 1996; Pavlik y col. 1999; Whittington y col. 2000; Möbius y col. 2008) y a través del análisis de mutaciones presentes en esta misma secuencia (Castellanos y col. 2009; Sohal y col. 2009).

REPETICIONES EN TÁNDEM DE NÚMERO VARIABLE (*VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS*, VNTR)

Las secuencias de ADN repetidas en tándem se encuentran presentes en los genomas tanto de organismos procariotas como de eucariotas y reciben el nombre de VNTR (Jeffreys y col. 1985; Supply y col. 2000). Los VNTR se encuentran dentro del grupo de elementos repetitivos en tándem distribuidos en el genoma y se caracterizan por la variación en el número de repeticiones para un mismo VNTR, que difiere entre individuos; los cuales pueden ser detectados mediante PCR, con oligonucleótidos dirigidos a regiones adyacentes. Estas secuencias presentan además, un gran índice de variabilidad genética y por lo tanto presentan un alto poder discriminativo (Keim y col. 2000). El poder discriminativo de un método de tipificación, se relaciona con la capacidad que tiene este para distinguir entre cepas no relacionadas, lo cual es determinado por el número de tipos diferentes y las frecuencias relativas en las que se encuentran estos tipos (Hunter & Gaston 1988).

Los VNTR se clasifican en microsatélites (SSR) y minisatélites en función de la longitud de las secuencias repetidas (Deka y col. 1992). Los microsatélites presentan secuencias repetidas de entre 1-13 pb y los minisatélites entre 10-100 pb. Estas

secuencias repetitivas, sirven como herramienta para la subtipificación molecular de diferentes organismos procariotas que presentan un bajo índice de heterogeneidad genética y un elevado índice de estabilidad genética (Lindstedt 2005). En el caso específico de *Map*, la identificación por VNTR fue basada en el tamizaje del genoma total de *Map*-K10 y probados por ensayos de polimorfismos, en diversos paneles de cepas. Distintos locus VNTR han sido utilizados para la subtipificación molecular de *Map* (Overduin y col. 2004); así como también en combinación con unidades intergénicas repetidas de micobacterias (MIRU) (Harris & Barletta 2001). En el año 2007, Thibault describió un sistema de tipificación multilocus (MLST) en el que incluyó 8 loci diferentes para aplicar a una colección de 183 aislados de *Map* obtenidos de 10 países. De los ocho loci analizados, seis presentaron estructura de VNTR (3, 7, 10, 25, 32 y 47) y dos estructura de MIRU (X3 y 292). Este análisis multilocus han sido utilizados en diferentes estudios con el objetivo de subtipificar a *Map* (Gioffré y col. 2015; van Hulzen y col. 2011). Esto permite un incremento en el poder de discriminación y también facilita el entendimiento de los mecanismos genéticos que conducen a la diversificación y evolución dentro de las especies. No obstante, debido a que los aislamientos de *Map* muestran muy bajo nivel de heterogeneidad genética en comparación con *M. tuberculosis* y otras bacterias, la combinación de dos o más métodos de tipificación, como por ejemplo VNTR-MIRU y IS900-RFLP, puede conducir a un incremento en el poder de discriminación en la tipificación. Este enfoque ya ha sido empleado en distintos estudios (Thibault y col. 2007; Möbius y col. 2008; Stevenson y col. 2009; Radomski y col. 2010). En varios trabajos se consiguió subdividir el grupo de IS900-RFLP mayoritario de *Map* en diferentes subgrupos, por medio de análisis de repeticiones-tándem de número variable de múltiples locus (MLVA) (Overduin y col. 2004).

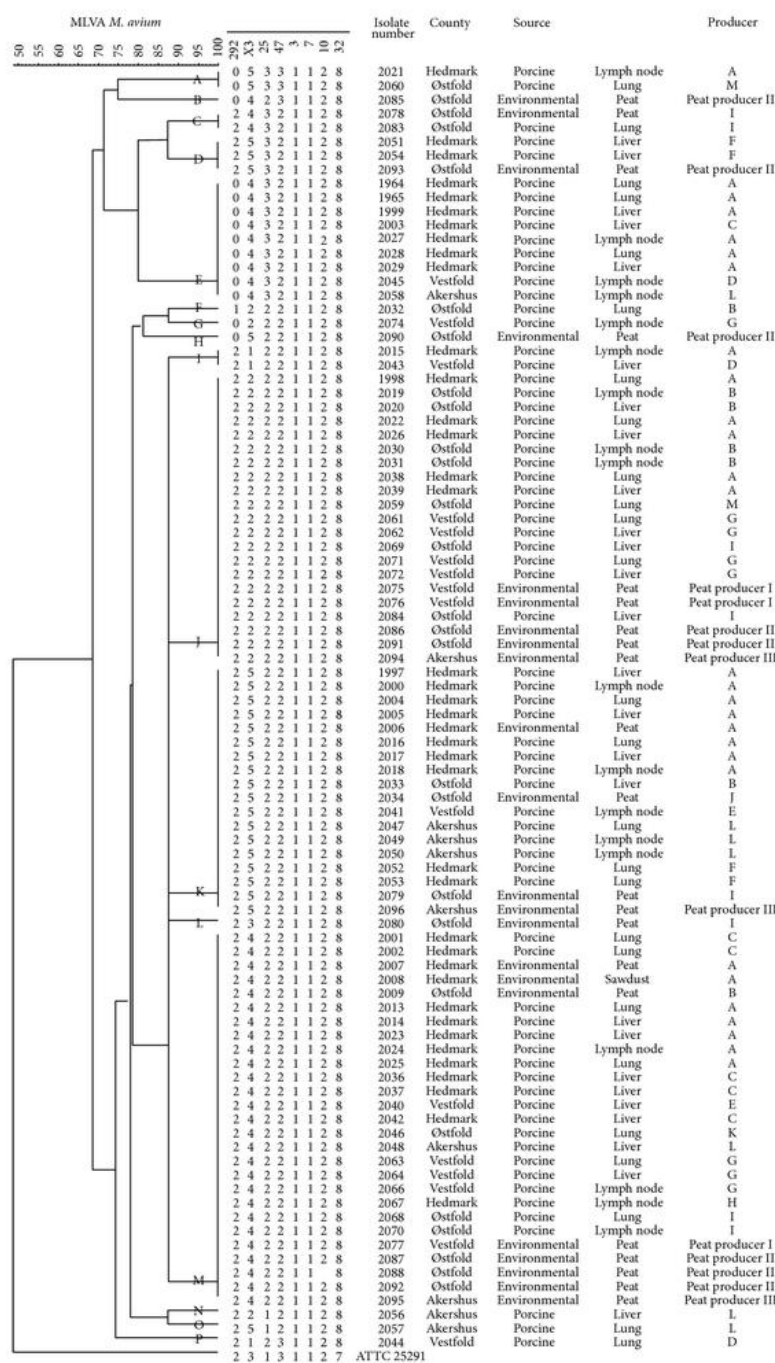


Figura 4: Dendrograma que muestra la relación genética entre los aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* aislados de cerdos. El dendrograma se basa en el análisis de ocho locus MLVA los cuales también son utilizados para Map (Johansen y col. 2014).

Otras técnicas que han sido desarrolladas para la caracterización genética de Map, además de las ya mencionadas son: la electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), el análisis de las diferencias

representacionales (*Representational differential analysis*, RDA), el análisis de polimorfismos de fragmentos largos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP), la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) mediante la técnica de HRM (Curvas de disociación de alta resolución), entre otras. La utilización de estas técnicas depende del objetivo particular de cada investigación (Stevenson y col. 2015; Biet y col. 2012).

DIVERSIDAD DE LAS CEPAS DE MAP

Observaciones fenotípicas así como estudios epidemiológicos y moleculares, han evidenciado la heterogeneidad en los distintos aislamientos de Map. Los cuales se han clasificado en dos grandes grupos o tipos de cepas, las bovinas y las ovinas. Esta diferenciación fue realizada por primera vez mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism analysis*, RFLP) en combinación con la hibridización con la secuencia IS900, (IS900-RFLP) (Collins y col. 1990; Pavlic y col. 1999). Luego se hizo la denominación de 3 tipos de Map, de acuerdo a las especies en las cuales fueron aisladas: cepas ovinas o Tipo “S” (*Type sheep*) aisladas de ganado ovino; cepas bovinas o Tipo “C” (*Type cattle*) obtenidas principalmente de ganado bovino, y Tipo intermedio o “I” aisladas de pequeños rumiantes (Collins y col. 1990). Posteriormente se encontró que estos tipos de Map pueden también ser aislados de diferentes especies y que por lo tanto, las especies de origen no son necesariamente un indicador adecuado del tipo de cepa. Por lo tanto se propuso denominar a estas cepas como: Tipo I (que corresponde al Tipo S), Tipo II (correspondiente al Tipo C) y Tipo III (o Tipo Intermedio) (Stevenson y col. 2002; de Juan y col. 2005). Los avances en las técnicas de tipificación molecular han hecho posible la diferenciación genética entre los distintos aislamientos de Map, así como la identificación de otros tipos de este microorganismo. Mediante la utilización del ensayo IS1311 PCR-REA se logró identificar además de las cepas ya descritas, otro tipo de cepa obtenida a partir de muestras de bisontes, denominándose Tipo B (*Type bison*), (Figura 5)

(Sohal y col. 2009; Whittington 2009), esta caracterización se realizó mediante la utilización de SNPs, polimorfismo en un solo nucleótido, que se diferenciaron primero en que todas las copias de IS1311 en cepas tipo-B tienen una T en la posición 223 mientras que las cepas de Tipo S tienen todas una C y las cepas de Tipo C tienen algunas copias del elemento IS1311 con C y otras con T, en la posición 223. Otros análisis de los aislados de tipo B reveló que los aislados de este tipo de la India eran diferentes de los aislados de los bisontes de EE.UU. y estos se conocieron como "tipo bison indio" (Sevilla y col. 2005). Más recientemente, se han identificado cepas de bison tipo indio mediante una delección de TG en las posiciones 64 y 65 de IS1311 en el locus 2 (Sohal y col. 2013). Las cepas de tipo bison indio son un sub-linaje de las cepas de tipo C (Figura 5). En cuanto a las cepas aisladas de camellos en Arabia se consideran un sub-linaje de las cepas de tipo S.

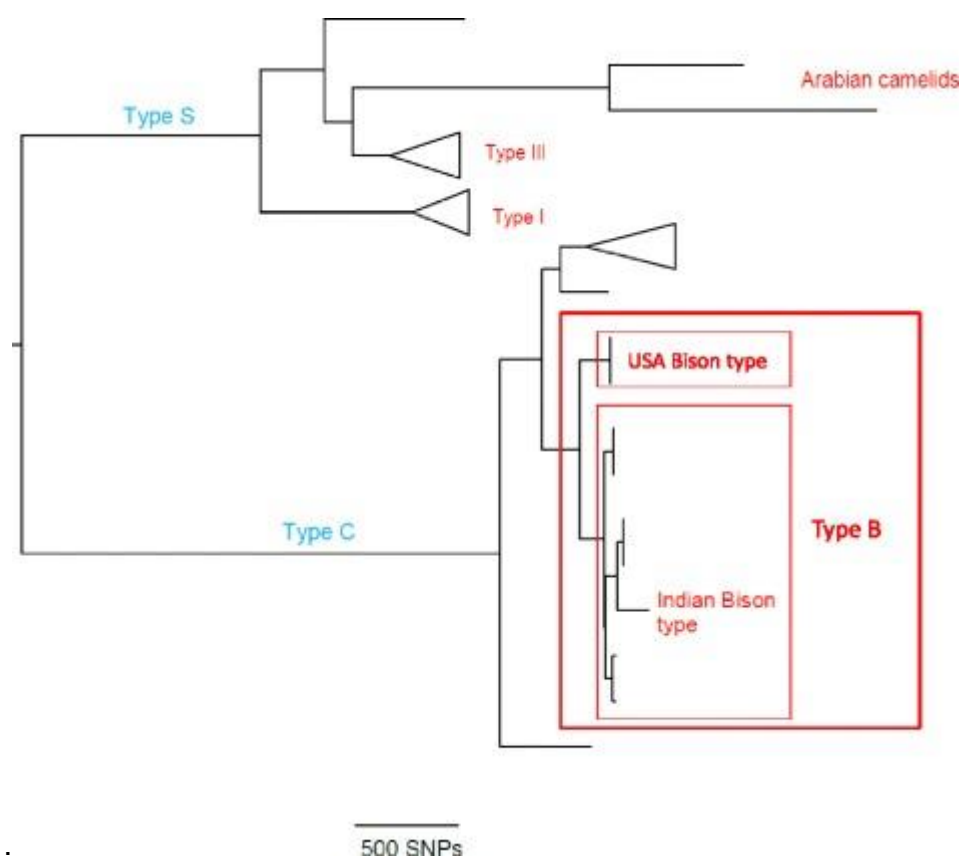


Figura 5: Árbol filogenético de los tipos de cepa Map basado en SNPs .(Stevenson y col. 2015).

A nivel epidemiológico parece existir cierta tendencia de los tipos de Map a asociarse con aspectos como la transmisión, preferencia por el huésped y susceptibilidad a la infección; sin embargo las distintas metodologías empleadas en los diferentes estudios publicados sobre aislamiento y tipificación de Map, han hecho difícil el entendimiento de estas asociaciones. No obstante, existen evidencias fenotípicas y genotípicas que diferencian a las cepas de Map. Fenotípicamente se distinguen por el tiempo en que tardan en crecer, el tipo de medio de cultivo en donde se pueden aislar y otra característica es la pigmentación que presentan algunas cepas de origen ovino y que no ha sido observada en las cepas bovinas (Stevenson y col. 2002).

Con respecto a las preferencias por el huésped, se ha encontrado que las cepas que tienen más amplio rango de huéspedes son las del Tipo II, ya que han sido comúnmente aisladas de diferentes especies de animales, tanto rumiantes como no rumiantes (Greig y col. 1999), así como de muestras de humanos pertenecientes a pacientes con enfermedad de Crohn (Bull y col. 2003; Paustian y col. 2008). En cambio, las cepas del Tipo I han mostrado tener mayor restricción por los huéspedes a los que infectan, ya que se han aislado más comúnmente de ovinos y caprinos (Sevilla y col. 2007). Otros reportes muestran que los ovinos también son susceptibles a las cepas del Tipo II (Stevenson y col. 2009; Stevenson y col. 2015; Verna y col. 2007) ocasionándoles la enfermedad.

La distribución geográfica de los distintos tipos de cepas de Map, está probablemente influenciada por factores tales como: el movimiento de animales de una región geográfica a otra, la virulencia de las cepas (Verna y col. 2007) y los sistemas de manejo en los campos. A pesar del gran avance que se ha tenido con respecto a la epidemiología molecular de Map, es necesario profundizar sobre los rasgos fenotípicos, epidemiológicos y patogénicos observados entre las distintas cepas.

ENFERMEDAD DE JOHNE O PARATUBERCULOSIS

La infección se produce mayormente en los animales jóvenes, principalmente por contacto directo con las heces infecciosas en el parto, o al ingerir calostro o leche contaminados provenientes de un animal enfermo (Clarke 1997). El periodo de infección suele ser temprano, a partir de las primeras semanas de vida, momento en el que poseen la mayor susceptibilidad. La vía principal de ingreso es fundamentalmente fecal oral (Clarke 1997; Collins y col. 1996) aunque también se han descrito otras como la intravenosa (Merkal y col. 1968), la intramamaria (Merkal y col. 1968) y la intrauterina (Thayer y col. 1984).

El período de incubación es variable, pudiendo oscilar de 2 a 8 años, este tiempo depende de la edad inicial de exposición, de la dosis infectiva y del estado general del animal, de manera tal que a mayor dosis infectiva y a menor edad al momento del contacto, el período de tiempo para que aparezcan los signos clínicos se acorta; y a menor carga bacteriana y a mayor edad, el período se alarga. (Körmendy 1988). Las micobacterias ingeridas al llegar a la luz intestinal son captadas por las células M, de las placas de Peyer y/o los enterocitos, siendo posteriormente fagocitados por los macrófagos de la submucosa (Momotani y col. 1988; Sigurðardóttir y col. 2004). Map sobrevive dentro de los macrófagos mediante la inhibición de la maduración del fagosoma (Cheville y col. 2001; Woo & Czuprynski 2008) generando así la localización y colonización en varias áreas intestinales, como la válvula ileocecal y linfonódulos. Al producir lesiones granulomatosas con gran contenido de bacterias estas se eliminan en la materia fecal, regenerando el ciclo de infección. En el transcurso de la enfermedad se produce una ileocolitis granulomatosa que culmina con la muerte del animal (Clarke 1994).

Map puede permanecer en el tracto gastrointestinal de animales subclínicamente infectados durante años sin causar síntoma alguno de la enfermedad, los cuales pueden llegar a manifestarse debido al estrés, como por ejemplo durante la lactancia (normalmente en la segunda o tercera lactación) o durante el parto temprano, o otras causas no fisiológicas como una elevada

densidad de animales entre otros factores (Manning & Collins 2001). Sin embargo, aunque los animales son más susceptibles cuando la infección se origina a edades tempranas, hasta el desarrollo clínico de la enfermedad pueden transcurrir meses o incluso años. La enfermedad también se puede iniciarse en animales adultos si éstos se ven expuestos a una elevada carga infectiva de Map (Rankin 1961). En lo que respecta a la susceptibilidad genética de los animales diversos factores como los asociados a especie y raza han sido propuestos (van Hulzen y col. 2014; Gonda y col. 2007; van Hulzen y col. 2012)

Se describe en relación a esta enfermedad la posibilidad de la existencia de animales súper-eliminadores de micobacterias, estos animales eliminan 10.000 bacterias más por gramo de materia fecal que las que normalmente excreta un animal con paratuberculosis. El fenómeno de súper-eliminadores se ha descrito en otras enfermedades bacterianas como la *Escherichia coli* verotoxigénica H7 O157 y virales como SIDA, SARS (Stein y col. 2011). Los factores que se combinan para que un animal enfermo se convierta en súper-eliminador son variados, entre ellos pueden ser, las infecciones intercurrentes, la genética del hospedador y del patógeno. En un rodeo con paratuberculosis del 2 al 20% de los animales con cultivo positivo corresponden a súper-eliminadores. En esta enfermedad los súper-eliminadores se dan como consecuencia del progreso natural de la enfermedad, cualquier animal que elimina micobacterias puede convertirse con el tiempo en súper-eliminador si no se elimina del rodeo (Collins y col. 2005).

Algunos investigadores han postulado que existe un fenómeno conocido como “pasaje” que sugiere que algunos bovinos adultos eliminarían a Map por las heces durante 1 a 7 días después de la ingesta de las bacterias presente en el medio ambiente, pero la bacteria no colonizaría la mucosa gastrointestinal de los mismos. Estos animales tendrían aislamientos positivos en materia fecal, de escasa cantidad de micobacterias, en rodeos muy infectados y serían eliminadores pasivos de micobacterias en la materia fecal, debido a que las micobacterias transitan por el tracto digestivo y se aíslan en los cultivos, pero los animales son sanos a pesar que se comportan como si fueran enfermos eliminadores (Collins y col. 1996). El número de estos animales depende de la presencia de animales súper-eliminadores. La

cantidad de materia fecal que necesitaría ingerir un adulto para convertirse en un eliminador pasivo sería de aproximadamente 1 gramo de materia fecal con una concentración de 3×10^6 UFC/gr. La diferencia entre un eliminador pasivo y uno activo es que el animal eliminador pasivo deja de eliminar a los 14 días de detectado el cultivo, en cambio el activo continúa eliminando en el tiempo (Hines y col. 2007). Un animal súper-eliminador elimina al medio ambiente más bacterias que 2.000 eliminadores moderados y más que 20.000 eliminadores pasivos.

ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD

La progresión de la enfermedad se divide en cuatro estadios o fases:

-Primer estadio (infección silente)

No presenta los signos clínicos, ni diseminación bacteriana, ni anticuerpos circulantes detectables. Presente normalmente en terneros y novillos.

-Segundo estadio (infección subclínica)

El animal podría diseminar escaso número de bacterias que están por debajo del límite de detección del cultivo, no presenta signos clínicos e inmunológicamente se puede detectar mediante el estudio de la inmunidad mediada por células o presencia de anticuerpos circulantes.

-Tercer estadio (enfermedad clínica incipiente)

Los animales pierden peso en forma gradual y tienen diarrea acuosa, al principio intermitente. En este estadio usualmente se detectan las bacterias y los anticuerpos circulantes. La mayoría de los animales si no se eliminan del rodeo pasan al siguiente estadio.

-Cuarto estadio (enfermedad clínica avanzada)

Se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, emaciación y edema submandibular. Los animales eliminan abundante cantidad de micobacterias y generalmente tienen elevada cantidad de anticuerpos y escasa o nula respuesta celular (Collins y col. 1996).

Por cada animal que se detecta con manifestación clínica avanzada se estima la presencia de 1 a 2 con enfermedad clínica incipiente, de 4 a 8 animales subclínicos y de 10 a 14 con infección silente; de esta manera se llega a tener un total de 16 a 25 animales enfermos por cada animal con enfermedad clínica avanzada (Collins y col. 1996).

El desarrollo de la respuesta inmune que se presenta en un animal enfermo de paratuberculosis se muestra en la Figura 6, acompañado de la presencia de cultivo de Map y la aparición de los signos clínicos. La elección de los métodos diagnósticos debería basarse en poder detectar animales en todos los estadios para aumentar las posibilidades de controlar la presencia de esta enfermedad en el rodeo.

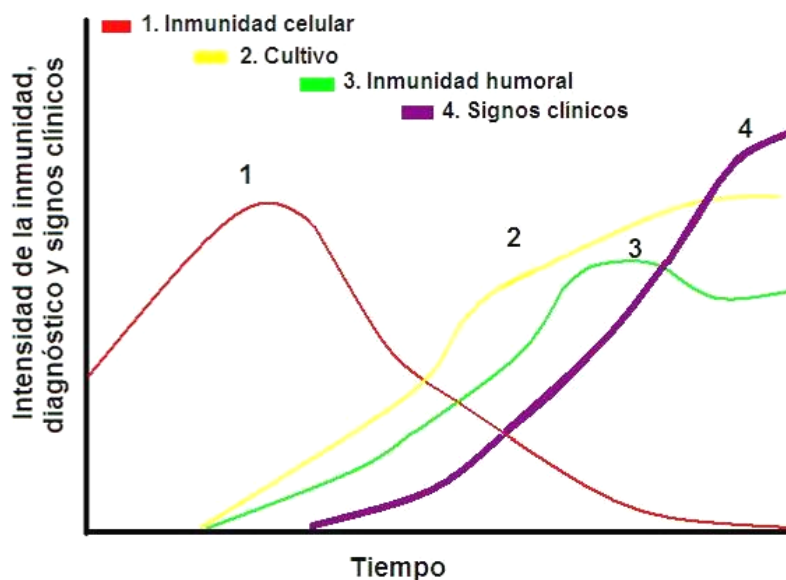


Figura 6: Progresión de la inmunidad celular, humoral, presencia de signos clínicos y utilización del cultivo en paratuberculosis. Adaptado de Chiodini, 1984

Sin embargo muchos investigadores han encontrado el desarrollo de respuesta inmune celular y humoral simultánea, y mientras la primera cae a medida que progresa la enfermedad, la segunda aumenta.

PREVALENCIA EN ARGENTINA Y AMÉRICA LATINA.

En nuestro país, Rosenbusch realiza por primera vez la descripción de esta afección en bovinos en 1932, en 1941 se describe en ovinos, en 1995 en cabras y en ciervos en el año 2000 (Rosenbusch 1937; Ubach 1941; Bernardelli y col. 2002). Recientemente se reportó la primera caracterización molecular de la cepa S en ovinos en Argentina (Travería y col. 2013). Los datos de la serología por la prueba de ELISA, demostraron que un 50% de establecimientos de la provincia de Buenos Aires están afectados con Map (Martinis Mercado y col. 2002). Se han descrito numerosos casos clínicos compatibles con esta enfermedad en los rodeos de la provincia de Buenos Aires, representando una de las principales causas infecciosas de muerte en los bovinos adultos (Costa y col. 2004; Moreira y col. 1994).

Además, en la Argentina, en relación al posible papel zoonótico de Map, se han realizado diversos ensayos para determinar la presencia de la bacteria viable en diferentes tipos de alimentos, con resultados diversos. Se evaluó la sobrevivencia de Map en quesos de origen caprino y bovino, encontrándose que puede permanecer viable hasta 60 y 45 días, respectivamente, después de la maduración con un tratamiento térmico de 37°C en quesos elaborados con leche contaminada con Map (Cirone y col. 2007). Posteriormente, Paolicchi y colaboradores informan el aislamiento de Map en un 2,86% de 70 muestras estudiadas de leche pasteurizada y ultra pasteurizada. Estos aislamientos fueron positivos a IS900 y correspondieron al patrón de RFLP C17, el más frecuente en nuestro país (Romano y col. 2005). Sin embargo, otros estudios donde se cultivaron 98 muestras de leche comercial homogeneizada y ultrapasteurizada para consumo humano de supermercados de la ciudad de Río Cuarto, en la provincia de Córdoba, en ninguna se evidenció crecimiento de Map (Magnano y col. 2009). Estos resultados dispares demuestran

que es necesario seguir investigando este aspecto bromatológico de gran importancia en nuestro país.

Los datos en Latinoamérica sobre la prevalencia en bovinos indican que aproximadamente el 76% de los rodeos presentan la enfermedad, con una prevalencia individual en bovinos del 17%, en ovinos del 16% y en caprinos de 7,4% a nivel de rodeo y de 3,7% a nivel individual (Fernández-Silva y col. 2014). La información sobre paratuberculosis en Argentina es escasa y parcial; se conocen sólo tres relevamientos que aportan datos de seroprevalencia individual: uno realizado en el suroeste de la provincia de Córdoba, en el que se describe una seroprevalencia de 5,3% (Magnano G y col. 2002), otro realizado en rodeos de cría de la Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, en el que se informa entre un 7,2% y un 19,6 % (Paolicchi y col. 2001), y el tercero en rodeos lecheros de la provincia de Corrientes, en el que se detectó una seroprevalencia del 7,6% (Martinis Mercado y col. 2002). Se ha postulado que ésta sería una de las enfermedades infecciosas más costosas para la industria láctea en USA, provocando pérdidas anuales estimadas en USD 200-250 millones (Ott y col. 1999). En nuestro país, las pérdidas derivadas de esta enfermedad fueron estimadas en USD 22 millones para la zona de cría de la cuenca del Salado y en USD 6,3 millones para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Passucci y col. 2007). Sin embargo son muy pocos los datos epidemiológicos actuales de la enfermedad en nuestra región (Fernández-Silva y col. 2014; Moreira y col. 1994).

DIAGNÓSTICO DE MAP

DIAGNÓSTICO DIRECTO

DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO.

Aunque no hay una correlación entre la severidad de los signos clínicos de la enfermedad de Johne y la extensión de las lesiones intestinales, hay signos característicos de la enfermedad como el engrosamiento de la mucosa intestinal, edema en intestino y en linfonodos mesentéricos y linfangiectasia.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE

Desde el punto de vista de las lesiones histopatológicas, se pueden categorizar las lesiones de acuerdo a la presencia de granulomas y su localización a nivel intestinal, intensidad y distribución de las lesiones, tipos celulares presentes en el infiltrado inflamatorio y la presencia de micobacterias.

Se describen como lesiones focales aquellas con granulomas pequeños y bien delimitados, con presencia de macrófagos (de 5 a 30), escasos linfocitos y células gigantes multinucleadas tipo Langhans, en la periferia de los granulomas no se observa tejido fibroso ni necrosis, el número de BAAR es escaso; estas lesiones aparecen preferentemente en la pared intestinal ileal, válvula íleocecal o en los linfonódulos regionales. En los linfonódulos mesentéricos en animales subclínicos se pueden encontrar microgranulomas, con presencia de macrófagos en el epitelio, lo cual puede servir como un diagnóstico *in vivo* a partir de biopsias (Buergelt & Ginn 2000).

Se describen como lesiones multifocales aquellas con localizadas en el tejido linfoide o en la lámina propia intestinal, se tratan de pequeños granulomas o células gigantes tipo Langhans rodeados por un ligero infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en el eje de las vellosidades sin modificar la arquitectura normal del intestino, la presencia de BAAR es moderada.

Las enteritis granulomatosas difusas severas se describen como lesiones difusas en varias áreas intestinales causando un marcado engrosamiento de la pared. Estas lesiones a su vez pueden ser de tres tipos, difusas multibacilares cuando presentan infiltrados difusos de macrófagos con citoplasma espumoso y células epitelioides, las vellosidades intestinales frecuentemente se fusionan y las glándulas se encuentran muy separadas por la presencia del infiltrado y en sus luces pueden observarse BAAR, los vasos quilíferos se encuentran dilatados y contienen macrófagos con BAAR, la submucosa y la zona más interna de la túnica muscular también puede verse afectada, la serosa puede presentar lesión en relación a los vasos linfáticos, en todos los casos no se observa necrosis; el segundo tipo son lesiones difusas linfocíticas (paucibacilares) en donde los linfocitos son las células predominantes que infiltran la lámina propia del intestino, hay pocos macrófagos y células gigantes; ocasionalmente se observan granulomas entre los linfocitos, el compromiso de la submucosa y serosa es menor, con presencia de células gigantes aisladas o pequeños granulomas. Finalmente las lesiones difusas intermedias en enteritis granulomatosas difusas se observan pequeños granulomas aislados formados por abundantes linfocitos, células plasmáticas, células gigantes y macrófagos, este infiltrado puede deformar las vellosidades y separar las glándulas intestinales (González y col. 2005).

EXAMINACIÓN DIRECTA.

Los cambios en la morfología patológica en bovinos asociados a paratuberculosis bovina se destacan por engrosamiento e inflamación de la pared del intestino, dilatación de vasos linfáticos y un aumento en los nódulos linfáticos. Sin embargo, para poder diagnosticar la enfermedad es preciso realizar también un análisis histológico de los distintos segmentos intestinales y de los linfonodos mesentéricos teñidos con los métodos de hematoxilina-eosina y Ziehl Neelsen, así como el cultivo de los mismos y posterior aislamiento del agente etiológico. Usualmente los análisis se realizan post mortem aunque es posible realizar biopsias.

Los cambios morfológicos no son específicos de paratuberculosis, por lo cual es necesario hacer técnicas complementarias.

La tinción se basa en el empleo de la tinción de Ziehl-Neelsen sobre un frotis obtenido a partir de la mucosa intestinal o de las heces. En el caso en el que se observen agregados bacterianos de bacterias ácido-alcohol resistente se puede realizar un diagnóstico presuntivo. Sin embargo, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes tampoco es específico de Map.

CULTIVO

Este es el método más empleado en la actualidad en la gran mayoría de los países y se considera la prueba de referencia (o *gold standard*). La principal desventaja que presenta este método es el crecimiento lento característico de Map (especialmente en el caso de las cepas del tipo I y III), además de la presencia de formas no cultivables de Map (Gunnarsson & Fodstad 1979; Whittington, Fell, y col. 2000). Sin embargo a pesar de que el Manual de Diagnóstico de la OIE indica que esta técnica presenta un 100% de especificidad, no dando lugar a falsos positivos, hay que considerar que este método no es concluyente, debido a la necesidad de confirmar por PCR la identidad de la micobacteria aislada (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016).

El cultivo a partir de heces en medio sólido es capaz de detectar entre el 30 y el 40% del ganado infectado, ya que únicamente detecta animales que excretan más de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de heces (Whitlock y col. 2000; Council 2003). El cultivo identifica a los animales en estadio clínico de la enfermedad avanzado (donde alcanza un 100% de sensibilidad) siendo detectados tan sólo unos pocos animales en los estadios iniciales (Whitlock y col. 2000).

Se han descrito diferentes medios de cultivo para Map, en los que destaca la necesidad de adicionar micobactina J. Así, los medios de cultivo recomendados por la OIE (todos con micobactina añadida) son el Herrold's con yema de huevo

(Herrold's egg yolk medium, HEYM) (Figura 7), Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11, medio Dubos y Löwestein-Jensen (LJ) (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016)

El método de procesamiento de la muestra más empleado es el originalmente descrito por Greig y colaboradores (Greig y col. 1999). Este método utilizado a partir de muestras de materia fecal presenta una sensibilidad de alrededor del 70% en bovinos en estadios clínicos, pero cuando se evalúan animales en estado subclínico la sensibilidad disminuye al 23-29% (Nielsen & Toft 2008). Cuando se evalúa la especificidad presenta un 100%, sin embargo pueden crecer otras micobacterias en el medio.



Figura 7: Cultivo de Map en medio sólido HEYM con micobactina donde se puede observar crecimiento de micobacterias, en dos soportes diferentes.

También se utilizan métodos de cultivo automatizados en medio líquido, los cuales generan una señal en respuesta al crecimiento microbiano. El cultivo radiométrico está basado en la detección del isótopo radiactivo CO_2 , el cual es liberado a partir del ácido palmítico (que contiene C_{14}) como consecuencia del metabolismo bacteriano. Este método detecta con mayor rapidez la presencia de crecimiento de Map en comparación con el cultivo tradicional en medio sólido, habiéndose descrito aislamientos positivos en nueve días tras la inoculación del medio de cultivo (Collins 1990). Sin embargo el empleo de isótopos radiactivos no es

posible en algunos laboratorios, además de ser un método de diagnóstico altamente costoso.

Los métodos no radiométricos más conocidos es el sistema denominado MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, de Becton Dickinson), es un tubo con medio líquido (Middlebrook 7H9), el cual posee una resina en el fondo del tubo, que tiene la capacidad de fluorescer bajo luz ultravioleta (365nm). Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno disuelto contrarresta las emisiones de la resina. Más tarde, debido al crecimiento bacteriano se consume el oxígeno y permite detectar la fluorescencia de la resina (Council 2003). Este sistema tiene un promedio de detección de crecimiento de micobacterias de 13 días, no utiliza elementos radioactivos, y puede utilizarse en un formato manual o un formato automatizado cuando los laboratorios tienen mayor volumen de muestras.

DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MICOBACTERIOFAGOS

Recientemente, la tecnología de amplificación de fagos ha sido explotada en ensayos de detección de bacterias viables. Para ello se emplea en el caso de *M. tuberculosis* el fago D29, es un virus constituido por ADN, que tiene la habilidad de infectar micobacterias. La principal ventaja de este enfoque es el hecho de que los fagos sólo infectan y amplifican dentro de las células vivas. También es utilizado en el caso de Map, en donde se puede estimar de forma rápida en 24-48 hs el número de células viables basado en el recuento de placas de lisis producidas en una placa con un césped de *M. smegmatis*. En la actualidad, hay disponible un ensayo de amplificación de fagos comercial (Ensayo FASTPlaqueTBTM, Biotec Laboratories Limited, Ipswich, Reino Unido). El mismo fue optimizado para la detección de Map por Foddai, logrando una correlación cercana al 100% entre Unidades Formadoras de Placa (UFP) y Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Foddai y col. 2009; Stanley y col. 2007). Posteriormente, teniendo en cuenta la amplia cantidad de micobacterias que son sensibles a infectarse con el micobacteriófago D29 (Rybniker

y col. 2006), se modificó el ensayo añadiendo una etapa de separación magnética utilizando perlas recubiertas con aglutinantes específicos de Map (Stratmann y col. 2002). De esta forma, se obtuvo una mayor especificidad al ensayo para la detección de Map. La aplicación de esta técnica en muestras de leche y materia fecal permitieron una detección rápida, sensible y específica, permitiendo la enumeración de Map viables en estas muestras (Foddai y col. 2011).

Sin embargo, la utilización de micobacteriófagos como método de diagnóstico presenta ciertas desventajas. En primer lugar, muestras con gran número de micobacterias pueden lisar completamente las placas conteniendo *M. smegmatis* sin poder detectar placas de lisis individuales y de esta forma no obtener resultados de la cantidad de Map que contiene la muestra. En segundo lugar, el manejo del agar y el cultivo de *M. smegmatis* fresco para la realización de las placas son de suma importancia dado que es un paso crítico para la correcta formación de placas de lisis.

En la actualidad, existen métodos alternativos en los cuales se modificó el micobacteriófago TM4 con un gen reportero, que expresa la proteína fluorescente verde o roja, por lo cual no es necesario determinar las UFP. La presencia de fluorescencia puede ser cuantificada mediante observación microscópica o mediante un fluorímetro de placa. Esta técnica es actualmente utilizada para la detección de resistencia a antibióticos en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes (Urdániz y col. 2016).

PRUEBAS MOLECULARES: PCR, PCR EN TIEMPO REAL

Para la realización de técnicas de diagnóstico molecular, en una primera instancia se realiza la extracción de ADN, la cual puede realizarse directamente desde el tejido o muestra biológica. Cuando la extracción se realiza de una colonia de cultivo se puede tan solo hervir las colonias. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica molecular comúnmente empleada dado que permite obtener resultados mucho más rápidos que otras metodologías como por ejemplo el

cultivo (Garrido y col. 2000). Los métodos de extracción de ADN para la determinación por PCR se pueden realizar sobre muestras de materia fecal (Garrido y col. 2000; Irenge y col. 2009; Kawaji y col. 2007), leche (Dundee y col. 2001; Djønne y col. 2003; Kaur y col. 2010), sangre y tejidos (Gwóźdź y col. 1997; Gwozdz y col. 2000; Juste y col. 2005).

El principal inconveniente de esta técnica es la presencia de inhibidores de la reacción, principalmente en muestras procedentes de materia fecal (Whipple y col. 1990; Garrido y col. 2000). La presencia de inhibidores se pueden eliminar mediante un paso adicional de purificación del ADN (Choy y col. 1998) o mediante diluciones del ADN extraído (Garrido y col. 2000).

En cuanto a la determinación de Map por PCR, la más usada está basada en la amplificación de la secuencia de inserción IS900, aunque se determinó que hay micobacterias que contienen una secuencia parecida y por lo tanto pueden obtenerse reacciones falsas positivas (Englund y col. 2002). Algunos trabajos en los cuales se evaluó la sensibilidad y especificidad mediante análisis Bayesiano para la PCR-IS900 presentaron una sensibilidad entre 29 y 60% y una especificidad entre 97% y el 99.3% (Wells y col. 2006; Alinovi y col. 2009).

Existen ciertas controversias en cuanto a la sensibilidad de la PCR como método diagnóstico. Ciertos autores consideran, en términos generales, que es una técnica menos sensible que los métodos de cultivo de heces tradicionales (Englund y col. 1999; van der Giessen y col. 1992), sin embargo otros autores han encontrado valores de sensibilidad similares o superiores al cultivo (Vary y col. 1990; Collins, y col. 1993; Collins y col. 1993; Sockett y col. 1992; Stevenson & Sharp 1997), principalmente en ovinos (Garrido y col. 2000). Esta discrepancia en los resultados obtenidos reside en la gran heterogeneidad de metodologías empleadas, que impiden comparar los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios (Garrido y col. 2000). Por otro lado, en los últimos años se ha reportado un trabajo donde se realiza la amplificación simultánea en tiempo real de las secuencias IS900, ISMAP02 y f57 de Map obteniéndose resultados rápidos, específicos y con alta sensibilidad en comparación con los métodos convencionales (Irenge y col. 2009). Cabe destacar, que se ha demostrado que la sensibilidad de la PCR en muestras de tejido es mayor

que a partir de heces, dado que presentan menos inhibidores de la reacción (Garrido y col. 2000). Se considera que las muestras en las que se obtienen mejores resultados son aquellas en las que se realiza la extracción de ADN de válvula ileocecal y del nódulo linfático mesentérico (Gwózdź y col. 1997). Además, existe la posibilidad de llevar a cabo esta técnica a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (Miller y col. 1999; Plante y col. 1996; Miller y col. 1997; Whittington y col. 1999). En el año 1997, Miller y colaboradores emplearon esta técnica para el diagnóstico de *M. bovis* a partir de muestras fijadas previamente y dos años más tarde, los mismos autores (Miller y col. 1999) consiguieron aplicar esta técnica para el diagnóstico del MAC en muestras de rumiantes procesadas para estudios histológicos, utilizando, entre otros, los primers para las secuencias IS900 específica de Map, y para la identificación de Maa se utilizaron los dirigidos a la secuencia IS1245. En el caso de muestras de no rumiantes (aves y cerdos) se utilizan primers que amplifican la secuencia 16S rRNA de micobacterias y posterior secuenciación para su correcta identificación. En cuanto a la sensibilidad en un estudio comparativo para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos entre estas variantes: PCR, ZN y técnicas inmunohistoquímicas, se obtuvieron sensibilidades del 90, 86 y 100%, respectivamente, aunque las dos últimas técnicas no son 100% específicas como la primera (Plante y col. 1996). No obstante, cuando se utilizan para la PCR muestras de tejido fijadas en formol, es importante tener en cuenta el tiempo de fijación, aconsejando que éste no supere las 24 horas, debido a que el formol fragmenta el ADN.

Finalmente, la cuantificación de Map presente en muestras clínicas puede realizarse mediante PCR en tiempo real (Sidoti y col. 2011; Herthnek & Bölske 2006). Esto se realiza utilizando un plásmido que contiene la secuencia de IS900 o un ADN proveniente de cultivo previamente cuantificado en base a sus unidades formadoras de colonias, con los cuales se realizan diluciones seriadas, para realizar una curva patrón en base a sus Ct (Temperatura de melting) con la que luego son comparados los resultados obtenidos para cada una de las muestras y se correlacionan con las UFC obtenidas de la curva patrón. La sensibilidad de esta técnica fue comparado con resultados obtenidos en base a cultivo radiométrico obteniendo una sensibilidad similar (Kawaji y col. 2007).

DIAGNÓSTICO INDIRECTO

TEST DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (COMPLEMENT FIXATION TEST, CFT).

Esta prueba ha sido empleada como estándar para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ganado vacuno. Se caracteriza por su capacidad para detectar animales altamente infectados, sin embargo es una técnica que presenta una baja sensibilidad y tiene tendencia a producir falsos positivos (Whitlock y col. 2000). Está especialmente indicada en animales con sospecha de infección clínica, sin embargo su aplicación como herramienta de control poblacional de la enfermedad de Johne es limitada. En la actualidad, este ensayo es demandado por algunos países en los que se importa ganado vacuno (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016).

INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (AGAR-GEL IMMUNODIFFUSION, AGID).

Esta prueba está principalmente indicada para la confirmación de la enfermedad de Johne en ganado caprino, ovino y vacuno con presencia de signos clínicos (Sherman y col. 1984). Se basa en la detección de anticuerpos. El empleo de esta técnica en pequeños rumiantes en Nueva Zelanda y Australia ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA (Whittington y col. 2000). La aplicación de este ensayo en el diagnóstico de animales subclínicamente infectados es reducida, aunque presenta mayor sensibilidad y especificidad en comparación con la prueba de CFT (Sherman y col. 1990).

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA).

Es un método basado en la detección de anticuerpos de Map a partir de suero bovino y muestras de leche, provee un resultado rápido frente al cultivo. En los primeros estadios de la infección en bovinos puede no detectarse anticuerpos, ya que la aparición de los mismos está asociada con la progresión de la enfermedad y la aparición de lesiones histológicas

Esta técnica se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de CFT y AGID, ya que detecta animales subclínicamente infectados. Esta técnica es capaz de detectar entre un 30-40% del ganado vacuno identificado como positivo por el cultivo de heces en medio sólido (Whitlock y col. 2000). Sin embargo, esta sensibilidad depende de la edad del animal, aunque hay estudios en los que se ha calculado que la sensibilidad global total estimada para los diferentes grupos de edad es del 15% (Whitlock y col. 2000; Jubb y col. 2004). No obstante, en pequeños rumiantes el ELISA comercial es el que presenta una mayor especificidad (entre el 98,2 y el 99,5%) en aquellos animales que presentan lesiones anatomopatológicas (Hope y col. 2000). Entre las principales ventajas de esta técnica se destacan la automatización, la repetitividad, el elevado número de muestras que se pueden analizar y la objetividad de los resultados (Manning & Collins 2001). En la actualidad es una de las pruebas más utilizadas para la determinación del nivel de infección en los rodeos (Nielsen y col. 2001). Además, la descripción de nuevos antígenos y nuevas formas de detección de los anticuerpos están permitiendo el desarrollo de nuevos ELISAs con mayores valores de sensibilidad y especificidad (Griffin y col. 2005; Eda y col. 2006; Speer y col. 2006; Mon y col. 2014).

ENSAYO DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CÉLULAS

Se ha evidenciado que la inmunidad mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables y por lo general, los animales que se encuentran subclínicamente infectados con Map normalmente no reaccionan a las pruebas serológicas pero si producen una reacción positiva a los ensayos que miden la inmunidad mediada por células (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016). Sin embargo, otros autores han reportado que se puede detectar anticuerpos específicos en animales infectados con Map en periodos tempranos de la enfermedad (Begg y col. 2011). La presencia de respuesta temprana de anticuerpos y baja respuesta celular en los terneros en campos con paratuberculosis será discutido en esta tesis.

PRUEBA DEL GAMMA INTERFERÓN.

Este ensayo está basado en la detección de la respuesta inmune mediada por células mediante la cuantificación de producción de gamma interferón (IFN- γ) por los linfocitos periféricos estimulados con antígenos específicos. El incremento de los niveles de IFN- γ ocurre primero que la excreción del agente en materia fecal en bovinos infectados con Map (Huda y col. 2003). Se ha demostrado que animales infectados resultan positivos a IFN- γ a los 26 meses de edad, resultando positivos a cultivo alrededor de los 37 meses promedio (Huda y col. 2003). Este ensayo presenta una sensibilidad y especificidad que varía ampliamente en bovinos infectados con Map y puede ser alterado por la edad de los mismos, la exposición a micobacterias ambientales, criterios de interpretación y del purificado proteico utilizado para estimular las muestras. Los antígenos específicos más utilizados para estimular a los linfocitos de sangre periférica a liberar IFN- γ para el diagnóstico de paratuberculosis son: la tuberculina aviar, PPDA (derivada de la proteína estándar aviar purificada) o la johnina, PPDP (proteína purificada a partir de una cepa de Map) (Collins y col. 1990). La detección cuantitativa del IFN- γ producido se realiza a través

de un ELISA de tipo sándwich, el cual emplea anticuerpos monoclonales dirigidos al IFN- γ .

En la literatura se ha descrito que la especificidad de este ensayo varía entre el 67 y el 94% (Kalis y col. 2003) en función de los criterios de interpretación del mismo, ya que este ensayo fue inicialmente desarrollado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Organización Mundial de Sanidad Animal 2016). Actualmente se está trabajando en el desarrollo de pruebas basadas en antígenos específicos tanto para tuberculosis como para paratuberculosis (Mon y col. 2014).

HIPERSENSIBILIDAD HYPERSENSITIVITY, DTH).	RETARDADA	(DELAYED-TYPE
----------------------------------------------	-----------	---------------

Esta prueba de hipersensibilidad retardada determina la inmunidad mediada por células que se produce tras la inoculación intradérmica de un antígeno y la posterior medición de la induración en el punto de inoculación a las 72 h. Inicialmente, los antígenos empleados para el diagnóstico de la paratuberculosis fueron la PPDA o PPDP. Ambos antígenos no presentan elevada especificidad, por las reacciones que ocurren en animales sensibilizados con otras especies de micobacterias (Inderlied y col. 1993).

Ha sido reportado que el antígeno johnina presenta una especificidad del 88,8% en ganado vacuno cuando el punto de corte de la induración dérmica es superior a 2 mm, del 91,3% si la induración es superior a 3 mm y del 93,5% si es mayor a 4 mm (Kalis y col. 2003).

En argentina estudios recientes desarrollados con la PPDA, demostraron que la aplicación intradérmica de este derivado proteico para el diagnóstico de paratuberculosis, en rodeos libres de tuberculosis, presenta una sensibilidad de 67% y una especificidad de 79.8%, obteniéndose los mejores resultados a los 20 meses de edad (Alvarado Pinedo 2015).

GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE BOVINA FRENTE AL PATÓGENO

Map igual que otras micobacterias son patógenos intracelulares, los cuales infectan preferencialmente macrófagos siendo capaces de sobrevivir e incluso replicar dentro de las células mononucleares del hospedador. Map en particular es capaz de prevenir la maduración de fagosoma y de esta forma limitar su destrucción y la presentación antigénica a otras células efectoras como células T. Así logra prevenir la apoptosis y persistir en los macrófagos infectados en el tejido intestinal. Se sabe que para controlar la infección es necesaria una respuesta coordinada en la cual están involucrados componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa. Frente a la persistencia del microorganismo dentro del macrófago el hospedador genera una respuesta produciendo una lesión característica de la patología denominada granuloma, la cual es una estructura dinámica constituida por macrófagos, células gigantes, fibroblastos y linfocitos B y T principalmente (Flynn & Chan 2001). Si bien el individuo con un sistema inmune competente puede controlar la infección aguda, el patógeno persiste dentro del granuloma en un estado de latencia (Gomez & McKinney 2004), como una infección subclínica. La alteración en cualquier mediador inmune importante o la depleción de células T pueden llevar a una reactivación de la enfermedad. Por lo tanto, la patología es una compleja lucha entre el microorganismo y la respuesta inmune del hospedador. Los avances realizados en el estudio de los mecanismos de evasión por parte del patógeno así como los distintos componentes de la respuesta del hospedador serán de gran relevancia para el desarrollo de vacunas y el tratamiento de la enfermedad.

Numerosos estudios han demostrado que las formas crónicas progresivas de la paratuberculosis implica un cambio en la respuesta inmune del hospedador de Th1 a Th2. De acuerdo con este paradigma, en analogía con la tuberculosis humana, Map puede inducir ambos tipos de respuesta inmune, pero durante la infección reciente la respuesta celular (Th1) domina, lo que conduce a la inhibición de la respuesta humoral (Th2). Inicialmente, la respuesta Th1 controla la replicación de Map, pero

cuando la infección progresa, la respuesta celular se sustituye por la respuesta humoral, produciéndose una menor capacidad para controlar a la bacteria.

Como se ha mencionado previamente en etapas tempranas de la infección existe una respuesta inmune mediada por células T (tipo Th1), la misma está caracterizada por expresión de interferón gamma y producción de inmunoglobulinas IgG2, la cual promueve la lisis de micobacterias en el interior de los macrófagos. En este estadio las lesiones son leves y se las denomina lesiones paucibacilares (Plain y col. 2011; Stabel 2000; Hostetter y col. 2002; Zurbrick y col. 1988). En etapas posteriores la respuesta inmune es predominantemente del tipo Th2 que se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas IgG1 específicas contra Map, esta producción es promovida por la liberación de IL-4 y/o IL-10 por parte de los linfocitos T CD4⁺; en esta etapa es característica la presencia de lesiones multibacilares (Stabel 2000).

Se ha demostrado que la infección por Map reduce la habilidad del macrófago de interaccionar con receptores CD40 de las células T. En particular, la habilidad del macrófago de producir IL-12 e iNOS en respuesta a la activación del receptor CD40 (Sommer y col. 2009). Está probado que la infección en bovinos con Map inicialmente genera una respuesta inmune pro inflamatoria y citotóxica en respuesta a los antígenos del mismo. Luego cerca de la transición de la enfermedad subclínica a clínica se observa una fuerte reactividad de los anticuerpos anti Map en suero con la reducción de la producción de interferón gamma por las células T (Coussens y col. 2012; Sommer y col. 2009). Una explicación de esta disminución de la respuesta T podría deberse a la acción de poblaciones de linfocitos T reguladores o supresoras de células productoras de IL-10 (Treg) que limita la respuesta de las células T productoras de IFN- γ en la patogenia de la paratuberculosis (Belkaid & Rouse 2005). Poblaciones Treg antígeno específicas aparecen en respuesta a muchas otras enfermedades infecciosas que desarrollan una fase subclínica de la enfermedad muy prolongada, como en el caso de Map. En estos casos las células efectoras y los linfocitos Treg parecen establecer un balance hospedador-patógeno reduciendo la inflamación y promoviendo la persistencia y transmisión del patógeno (Belkaid & Rouse 2005).

Se ha reportado que en la etapa clínica de la enfermedad en bovinos ocurre un aumento de la expresión de IL-10 y del factor de crecimiento (TGF- β) los cuales limitan la expresión de IFN- γ (Khalifeh & Stabel 2004). Datos más recientes han mostrado el papel de los macrófagos productores de IL-10 que actúan en la regulación de las respuestas Th1/IFN- γ y progresión de la enfermedad por Map en el ganado infectando. Shu y colaboradores demostraron un perfil mixto de citoquinas de tipo Th1 y Th2 asociados a altos niveles de IL-10 en monocitos derivados de sangre periférica (CMSP) y en linfocitos de linfonódulos mesentéricos (MLN) en animales con lesiones severas lo cual podría colaborar con la progresión de la enfermedad (Shu y col. 2011). Sin embargo otros trabajos han demostrado una asociación negativa entre IL-10 y la severidad de la enfermedad en animales experimentalmente infectados luego de 15 meses post infección lo cual muestra las propiedades de la IL-10 que pueden limitar la infección/inflamación por daño tisular (Subharat y col. 2012).

En bovinos crónicamente infectados en las cuales el patógeno persiste, se observa la presencia de una respuesta inmune celular específica mediada por linfocitos T y anticuerpos específicos, por lo cual no está claro por qué hay una carencia evidente de la eficacia de esta respuesta inmune para eliminar la infección. Entender los mecanismos de patogenicidad de Map se complica aún más por las variaciones en las respuestas inmunológicas entre bovinos naturalmente infectados y experimentalmente infectados (Begg y col. 2011). Parte de esta variación puede explicarse por factores genéticos del hospedador, factores genéticos de Map, así como factores ambientales como la dosis y la edad de la exposición (Gollnick y col. 2007; van Hulzen y col. 2014).

A nivel de rodeos es evidente que en campos donde la infección es endémica, los recién nacidos, que son altamente susceptibles, nacen en un entorno en el que Map está presente abundantemente, pero algunos terneros pueden escapar de la exposición y la infección durante los primeros meses de vida. Esto también se ha evidenciado en infecciones experimentales donde algunos terneros parecen resistentes a la infección. Las razones por las cuales este grupo particular de animales son resistentes no han sido determinadas. El hecho de que la mayoría de

los trabajos en los cuales se describe la patogenia y las respuestas inmunológicas se han realizado con animales experimentalmente infectados nos impiden conocer la protección natural contra la enfermedad sobre todo en los estadios tempranos de la infección. Además, sólo una pequeña proporción de los bovinos naturalmente y experimentalmente infectados desarrollan una infección progresiva llevando a una paratuberculosis clínica.

Partiendo de estudios de la enfermedad de Johne utilizando CMSP y suero aplicando pruebas diagnósticas, se ha sugerido que la progresión a la enfermedad clínica es el resultado de un cambio de una respuesta celular, potencialmente protectora, mediada por linfocitos T para derivar en una respuesta de anticuerpos no protectora (Sweeney y col. 1998; Stabel 2000). Además, se ha propuesto un papel de células reguladoras productoras de IL-10 en la patogenia de la paratuberculosis.

Sin embargo, sigue siendo una incógnita si los anticuerpos específicos de Map desempeñan un papel significativo en el control de las bacterias o si aceleran la progresión. Algunos autores sugieren que la pérdida de la inmunidad celular y la aparición de anticuerpos pueden ser simplemente indicativo de la progresión de la enfermedad, en lugar de resultar de la competencia directa entre dos ramas de la inmunidad adaptativa. Dicho cambio de respuesta ha sido extensamente estudiado en relación a la patogenia de la paratuberculosis. Investigaciones recientes postulan que dicho hecho puede ser consecuencia de la acumulación a nivel extracelular de la bacteria (Magombedze y col. 2014), asociado a la carga bacteriana con la cual los animales se infectaron, presentando una seroconversión a menor edad cuanto mayor es la cuantificación de Map en materia fecal (Lepper y col. 1989).

La sensibilidad de las pruebas diagnósticas se considera baja en las primeras etapas después de la infección de Map en terneros jóvenes (Collins y col. 1996; Nielsen & Toft 2008). Por lo tanto, cuando se aplican pruebas diagnósticas para paratuberculosis, por lo general sólo los bovinos mayores de 3 años de edad son los seleccionados para aplicar dichas pruebas (Collins 2011). Sin embargo, los ensayos de infección experimental detectaron respuestas de anticuerpos en animales jóvenes recientemente inoculados (McDonald y col. 1999; Waters y col. 2003; Mitchell y col.

2012; Kawaji y col. 2012). Por lo tanto, el diagnóstico temprano de la infección por Map requiere investigación adicional.

En esta tesis, revisamos los conocimientos actuales sobre la susceptibilidad dependiente de la edad y de las condiciones de alta o baja prevalencia de paratuberculosis en el rodeo.

POBLACIONES LINFOCITARIAS

Históricamente, las investigaciones se centraron en los linfocitos T CD4⁺; esta subpoblación tiene un rol protagónico en la respuesta celular frente a las micobacterias, pero cada vez hay mayor número de trabajos sobre la función de los linfocitos T CD8⁺. Ambas poblaciones celulares son de importancia ya que en infecciones experimentales de ratones con cepas virulentas de micobacterias tuberculosas se pudo comprobar el aumento de la población CD4⁺ y CD8⁺ en ganglios linfáticos de pulmón así como la presencia de células CD4⁺ y CD8⁺ con un perfil de memoria a las 2 a 4 semanas de la inoculación (Feng y col. 1999).

La participación de células CD4⁺ es una consecuencia obvia ya que como la micobacteria reside dentro del macrófago la presentación de antígenos se realiza principalmente en el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2 (MHC II). La principal acción de estas células es la producción de IFN- γ , una citoquina clave para la activación del macrófago, pero esta no sería su única función, también están implicadas en la maduración de las células presentadoras de antígenos (CPA), principalmente mediante la interacción de receptor y ligando ubicados en la membrana de la CPA y el LT CD4⁺ (CD40/CD40L). Además de la producción de IFN- γ , los linfocitos CD4⁺ son capaces de liberar otras citoquinas entre las cuales se destaca IL-2 que induce la proliferación celular, e inclusive son capaces de producir varias citoquinas simultáneamente: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-2 e IFN- γ . Este último grupo celular presenta un rol discutido en tuberculosis, por ser a la vez un marcador de protección y/o de tuberculosis activa (Qiu y col. 2012).

La presentación de antígenos en MHC I es posible gracias a que las micobacterias se localizan circunstancialmente en el citoplasma (McDonough y col. 1993). Este tipo de presentación antigénica es la vía de activación de linfocitos CD8⁺. Otra de las formas en que pueden ser procesados los antígenos para activar una respuesta citotóxica es por medio de la endocitosis de fragmentos apoptóticos de macrófagos infectados por parte de las células dendríticas comúnmente denominada presentación cruzada (Albert y col. 1998; Liébana y col. 1999). Las principales funciones de los CD8⁺ son la citotóxica y la producción de citoquinas para la activación del macrófago, compartiendo esta última función con los linfocitos CD4⁺. De acuerdo a lo expuesto la respuesta inmune protectora en infección por micobacterias patógenas puede ser definida como una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de IFN- γ por células T CD4⁺ y CD8⁺ es crítica para el control de la enfermedad.

Los linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$) intervienen tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Una importante característica innata de los LT $\gamma\delta$ es que reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en ausencia de células presentadoras de antígenos (Hedges y col. 2005), dado que los receptores de LT $\gamma\delta$ no están restringidos a MHC (Vantourout & Hayday 2013), pueden de esta forma responder rápidamente y desarrollar funciones efectoras sin expansión clonal implicándose en la protección durante la infección temprana (Tanaka y col. 1995). Estudios en modelos humanos y animales han demostrado que los LT $\gamma\delta$ tienen funciones diversas durante infecciones micobacterianas.

En bovinos en CMSP el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ es de aproximadamente 40% en neonatos y disminuye a 12% en adultos (Wilson y col. 1996). Dos subconjuntos principales de los linfocitos T $\gamma\delta$ se han identificado en rumiantes basados en la expresión de la glicoproteína transmembrana: WC1⁺ y WC⁻. Los linfocitos T WC1⁺ son los de mayor distribución en sangre de bovinos y están asociados a la respuesta inmunitaria temprana anti-micobacteriana aunque se desconoce en detalle su funcionamiento. Se sabe que secretan IFN- γ/β (Buza y col. 2009; Kennedy y col. 2002; Plattner y col. 2013) y que son reclutadas en el sitio de infección (Plattner y col. 2014).

En base a estas características podría ser un indicador sistémico temprano de la infección (Badi y col. 2010). Se cree que los linfocitos T WC1⁺ influyen en la función de los macrófagos, y por lo tanto juegan un papel crucial en la regulación de la inmunidad del hospedador durante la fase temprana de la infección por Map (Baquero & Plattner 2016).

En cuanto a los linfocitos B (LB), son los encargados de la respuesta inmune humoral, a través de la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas. En los bovinos se describen siete isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgE e IgA. Estas glicoproteínas desempeñan múltiples funciones entre ellas: como receptores celulares específicos de LB o como proteínas secretadas por plasmocitos pudiendo formar complejos inmunes con los antígenos específicos (Tizard 2013). Las diferencias isotípicas son estructurales y están relacionadas con la función de cada uno de los anticuerpos. Los hidratos de carbono ubicados en los sitios conservados de glicosilación de la porción del fragmento cristizable (Fc) de los anticuerpos afectan su reconocimiento por los receptores del tipo Fc (Kacskovics 2004). La regulación de la expresión de los diferentes isotipos es compleja y multifactorial. La IgM es el primer isotipo que producen y secretan los LB durante la respuesta primaria. Luego, a medida que avanza la respuesta, cambia el isotipo a IgG1, IgG2, IgG3, IgE o IgA, según las citoquinas circulantes. En los bovinos se asocia al perfil Th2 con el isotipo IgG1, mientras que al perfil Th1 se lo relaciona con el isotipo IgG2. El IFN- γ (producido por los LT Th1) induce el cambio del isotipo hacia IgG2 (Estes & Brown 2002). La acción de estas inmunoglobulinas es crítica en la respuesta contra infecciones bacterianas agudas en el bovino, dado que la IgG2 actúa como opsonina para la fagocitosis por parte de los neutrófilos, co-adyuvando este efecto, el IFN- γ activa a los neutrófilos para matar las bacterias que han sido fagocitadas (Ellis & Beaman 2004). En muestras de sueros de bovinos sanos, predominan los isotipos IgG1 e IgG2, los que se encuentran en similares cantidades. La IgA es la de mayor concentración en secreciones y saliva. Mientras que la IgG1 predomina en calostro y leche. En el tracto gastrointestinal, similares cantidades de IgG1 e IgA fueron descriptas (Butler 1983). En paratuberculosis el estudio de IgA en suero, no mostró diferencias entre los grupos de bovinos estudiados. En materia

fecal, el hallazgo de IgA fue aislado y en muy baja concentración; sólo se detectó este isotipo en 3 de 11 de los bovinos infectados estudiados (Fernandez 2016).

En base a la problemáticas planteadas en cuanto al diagnóstico de la paratuberculosis en las etapas tempranas y a la respuesta inmunológica que la enfermedad presenta en los bovinos jóvenes decidimos trabajar en base a la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los bovinos infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* presentan marcadores tempranos de infección y protección específicos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la evolución de la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos nacidos en rodeos con paratuberculosis, para identificar marcadores tempranos de la infección y marcadores de protección y sus características.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de paratuberculosis en los rodeos de estudio con los test de diagnóstico convencionales.
2. Identificar marcadores tempranos de la infección.
3. Evaluar parámetros inmunológicos relacionados con protección a lo largo del ensayo. (IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p35, TNF- α , IL-17 e IFN- γ).
4. Evaluar en el tiempo las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺, CD21⁺).
5. Determinar las características genéticas de las cepas aisladas y su relación con la capacidad de persistir en el rodeo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados en la presente tesis.

RODEOS BOVINOS ENSAYADOS

En la presente tesis se trabajó con 3 rodeos con características particulares:



Rodeo con alta prevalencia de paratuberculosis

Se trata de un establecimiento agrícola-ganadero ubicado en el sur de la provincia de Buenos Aires, en la ciudad de Tandil, el mismo cuenta con una superficie total de 527 hectáreas (ha), con una cantidad total de 390 bovinos raza Holando Argentino, pertenecientes a la explotación lechera, de los cuales 180 se encuentran en la línea de producción, generando 17 litros diarios de leche, promedio.

En el establecimiento por trabajos previos se calculó la prevalencia real de paratuberculosis de un 30 % en base al cultivo de materia fecal, se utilizó un modelo Bayesiano previamente utilizado, que permite considerar valores de priors

informativas para la sensibilidad y especificidad (dichas priors se calcularon previamente con el programa BetaBuster y luego se cargó el modelo en WinBUGS14). (Tesis Alvarado-Pinedo.2015).

Rodeo con baja prevalencia de paratuberculosis

Se trata de un establecimiento agrícola-ganadero ubicado en el norte de la provincia de Buenos Aires, en la ciudad de Luján, el mismo cuenta con una superficie total de 360 ha, con una cantidad de total de 350 bovinos raza Holando Argentino, pertenecientes a la explotación lechera, de los cuales 120 se encuentran en la línea de producción, generando 29 litros diarios de leche, promedio.

En el establecimiento se calculó la prevalencia real de paratuberculosis de un 10 % en base a serología. se utilizó un modelo Bayesiano descripto previamente.

Rodeo sin presencia de la enfermedad

Se trata de un establecimiento agrícola ganadero ubicado en el noroeste de la provincia de Buenos aires, en el pueblo de Triunvirato, el mismo cuenta con 230 ha, con una cantidad total de 180 bovinos raza Holando Argentina, pertenecientes a la explotación lechera, con una producción diaria de 20 litros diarios de leche, promedio.

En el establecimiento se evaluaron los animales mediante serología y se observó que el mismo no presento resultados positivos, por lo cual se determino que el mismo presentaba un 0% de prevalencia a paratuberculosis.

MUESTRAS RECOLECTADAS DE LOS BOVINOS ENSAYADOS

Los animales de los tres rodeos fueron muestreados desde su nacimiento hasta los 20 meses de edad, realizando toma de muestras cada 60 días aproximadamente.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE BOVINOS

Se realizó una toma muestra de sangre entera anticoagulada de cada uno de los animales, a los diferentes tiempos de estudio, para ello se realizó una punción yugular con aguja de 18G o 16G acoplada a jeringa de 20 mL con heparina 20.000 U/mL (*Northia*). El volumen de muestra recolectado fue de 20 mL por animal.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL

Se tomó de cada uno de los animales materia fecal obtenida directamente de recto, la cual se mantuvo refrigerada para realizar los estudios correspondientes.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE.

Se tomaron 50 mL de muestras de leche provenientes de los tanques de los tambos de los distintitos establecimientos.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS REALIZADAS A LOS ANIMALES EN ESTUDIO

TEST DE TUBERCULINA-INTRADERMOREACCIÓN

Se les realizó la prueba tuberculínica, la cual consiste en la inoculación intradérmica de 0.1 mL de derivado proteico Maa cepa D4 ER inactivada (PPDA) 0.5 mg/mL, 25.000 UI/mL para determinar la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en el pliegue ano-caudal. Previamente a la inoculación se realiza la medida del pliegue con un calibre y luego de 72 hs de la inoculación, se realiza el cálculo de la diferencia del grosor de la piel (Figura 8).

La aplicación intradérmica se efectuó con una jeringa semiautomática McLintock, la misma está diseñada para cargar hasta 20 dosis, cada una de un volumen de 0,1 mL. Ensayos previamente realizados por el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense Madrid en 2011 para analizar, entre otras variables, la precisión de los volúmenes de cada aplicación de esta jeringa, demostraron que en el primer y el último disparo de cada carga los valores eran más altos y más bajos que el resto, respectivamente. Por lo tanto, en todos los ensayos realizados no se utilizaron dichas descargas.

Se registraron todas las diferencias observadas en los pliegues cutáneos, los animales con incremento en el pliegue cutáneo fueron considerados como reaccionantes a la prueba.

A631 (10 mm)

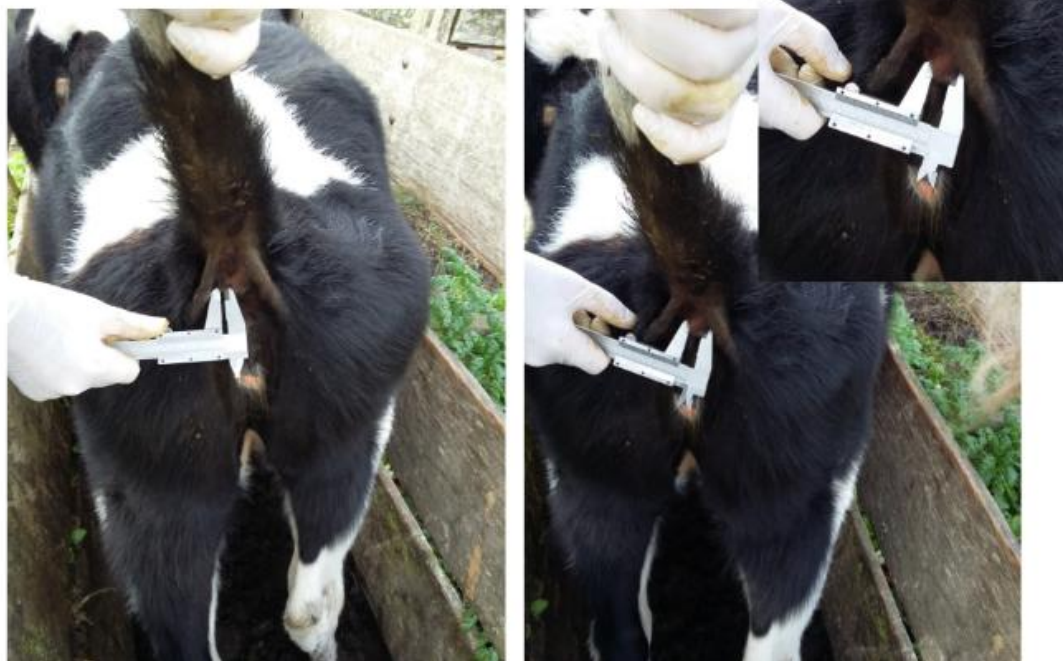


Figura 8: Realización del test de tuberculina en el pliegue ano caudal con reacción positiva observando un aumento de 10 mm a las 72 hs de la aplicación de PPDA.

ENSAYO DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)

El ensayo se realiza a partir de sangre entera anticoagulada. Se colocaron 200 μ L/hoyo de sangre en placas de 96 hoyos y se incubó con 25 μ L de los distintos antígenos por duplicado. Para el ensayo se utilizó PPDA y PPDB, en hoyos separados, a una concentración final de 50 μ g/mL y como controles se utilizaron Buffer fosfato (PBS) (control negativo) y pokeweed mitogen 4.5 μ g/mL (Sigma-Aldrich, Reino Unido)(control positivo). Los controles se utilizaron para cada muestra de sangre de cada animal. La placa se incubó en una estufa húmeda a 37°C con 5% de CO₂ durante 16 hs. Luego se centrifugó a 1.200 rpm y se procedió a tomar el sobrenadante (plasma estimulado) para determinar con el kit comercial de ELISA la

concentración de IFN- γ . Esta concentración de IFN- γ se determinó con un ELISA sándwich (BOVIGAM[®] TB Kit) según las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pocillos fondo plano, que contienen anti-IFN- γ bovino, y se colocó por pocillo 50 μ L del plasma o de los controles positivo/negativo con 50 μ L del diluyente comercial del kit y se lo incubó a 37°C por 1 hora. Luego se realizaron 6 lavados con el Wash Buffer, se le agregaron 100 μ L de la solución con el conjugado (anti-IFN- γ bovino con peroxidasa) y nuevamente se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavaron las placas y se colocaron 100 μ L del sustrato de la enzima. Después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente, cubierto de la luz, se le agregó la solución de stop. Luego de realizar el ELISA, las placas se leyeron a una absorbancia de 450 nm en un lector (Thermo Cientific) (Figura 9). Se obtuvieron los distintos valores de densidad óptica (DO) a partir del cual se calcularon los índices de densidad óptica (ODIs) ($ODI = OD$ de las muestras estimuladas con antígeno/ OD de la muestra estimulada con PBS). Como línea de corte se tomó como positivas aquellas muestras con una ODI igual o mayor a 2.



Figura 9: Placa de ELISA con la determinación de IFN- γ del plasma sanguíneo bovino estimulado.

TEST DE RESPUESTA HUMORAL-ELISA ANTÍGENO PPA-3

Para la determinación de anticuerpos totales contra el antígeno específico se utilizó el antígeno protoplasmático de paratuberculosis comercial PPA-3 (Allied Monitor, Inc. USA). La técnica se realiza en placas de 96-hoyos Maxisorp (NUNC)

fondo plano a la cual se agrega por hoyo 100 μ L de una solución 40 μ g/ml PPA-3 en buffer carbonato (pH: 9.6) y se incuba durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se descarta el excedente de la placa y se procede al bloqueo de los antígenos adheridos a la misma mediante el agregado de 100 μ L de la solución bloqueante (solución 0.5 % m/v de gelatina A porcina (Sigma) en PBS), y se incuba durante 1 hora a 37°C, luego se realizan cinco lavados con la solución de lavado (PBS/tween 20 al 0.1 %) y se procede al agregado de los sueros bovinos 100 μ L en una dilución 1/180 de los sueros en PBS, incubando nuevamente por una hora a 37°C. No se realizó pre-adsorción de los sueros dado que en ensayos preliminares se utilizó suero preadsorbido y sin adsorber, sin observarse diferencias en los resultados. En cada placa se agrega también, en la misma dilución del suero, los controles positivo y negativo, todos por duplicado.

Luego se realizan nuevamente 5 lavados con la solución de lavado y se incuba durante 30 min a 37°C con 100 μ L de una dilución 1/3500 de proteína G conjugada (BIO-RAD) a peroxidasa en PBS/tween. Por último se realizan 5 lavados con la solución de lavado y se agrega 50 μ L de la solución reveladora, sustrato (H_2O_2 /ABTS) lo cual genera una reacción colorimétrica, que es cuantificada midiendo con un lector de placas (Thermo Fisher) a una densidad óptica (DO) de 405 nm. Las medidas se realizan a los 20 y 30 minutos (Figura 10).

El punto de corte que se utilizó en este ensayo fue el promedio de las DO obtenidas para los animales negativos más dos desviaciones estándar.

TEST DE RESPUESTA HUMORAL-ELISA UTILIZANDO EL ANTÍGENO WA

Preparación del antígeno WA

El antígeno WA utilizado en esta prueba se obtuvo a partir de una cepa de *M. avium* subsp. *avium*, la cepa bacteriana D4ER cedida por SENASA. Para su mantenimiento y desarrollo se utilizó el medio sintético de Dorset-Henley y caldo

glicerinado fraccionado en botellas de vidrio estériles, se incubó el material durante aproximadamente 3 meses para obtener una capa superficial de desarrollo bacteriano de aproximadamente 2 cm de espesor. Posteriormente se realizó la cosecha de cada botella, el cultivo fue filtrado y las micobacterias inactivadas por radiación gamma. Luego de este proceso se rompieron las células mediante presión a 275 Mpa, el lisado es centrifugado por 30 minutos y el sobrenadante usado como antígeno. Protocolo previamente descrito y desarrollado en el CEDIVE (Centro de Diagnóstico Veterinario dependiente de la Universidad de La Plata) (Costanzo y col. 2012).

ELISA-WA

Para este ensayo se utilizó el mismo protocolo que el utilizado para el ELISA PPA-3, pero en este caso se adhirió a las placas el antígeno WA preparado en el CEDIVE.

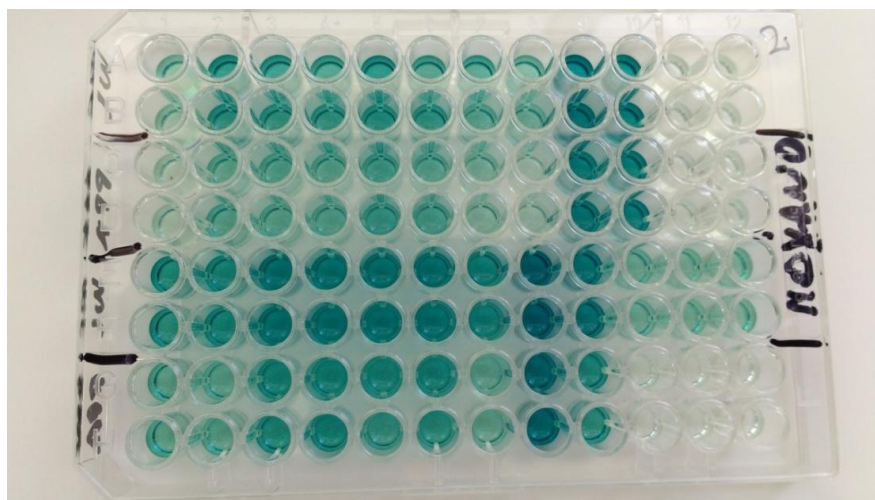


Figura 10: Placa de 96 hoyos con la determinación de anticuerpos anti-MAP luego del agregado de la solución reveladora.

El punto de corte que se utilizó en este ensayo fue el promedio de las DO obtenidas para los animales negativos más dos desviaciones estándar.

ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS DE IGG.

Se evaluaron los isotipos de IgG específicos frente a PPA-3 en sueros. Con la finalidad de eliminar reactividad cruzada (generada por otras micobacterias), se realizó la pre-adsorción de los sueros a evaluar con *M. phlei*. Se diluyeron los sueros 1/5 en una solución de *M. phlei* en PBS de DO=1 analizada a 600 nm y se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación seguido de 16 hs a 4°C. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C y se procedió al estudio del sobrenadante.

Las microplacas de 96 hoyos Greiner Microlon (GBO) fueron sensibilizadas con 2 µg/hoyo de PPA-3 (Allied Monitor) en 50 µL de solución de pegado (carbonato/bicarbonato 0,05M; PH = 9,6), durante 16 hs a 4°C. Luego del pegado del antígeno los hoyos fueron lavados tres veces con 100 µL de solución de lavado (0,05 % Tween 20 en PBS). Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con 100 µL de solución de bloqueo (10 % leche en polvo descremada (Svelty, Nestle, Buenos Aires, Argentina) en PBS). Posteriormente al bloqueo se agregaron 50 µL de los sueros pre-adsorbidos a una dilución final de 1/5 (para IgG2) o 1/100 (para IgG1) en solución diluyente (5 % leche en PBS) y se incubó durante 1 h a 37°C.

Luego, se agregaron 50 µL de los siguientes anticuerpos según el isotipo evaluado: anti-IgG1 bovino (Behtyl) diluido 1/250, o anti-IgG2 bovino monoclonal (Sigma-Aldrich) diluido 1/4.000 y para ambos isotipos se agregó el anti-IgG ratón-HRP (KPL) diluido 1/600. Finalmente, se incubaron con 50 µL de la solución de revelado: 1 mg ortophenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich) y 0,54 µL H₂O₂ 100 Vol., por mL de 0,05 M citrato fosfato (Sigma-Aldrich). La reacción se frenó con 50 µL de 1M SO₄H₂. La lectura se realizó en el espectrofotómetro OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA) a 490 nm.

Se utilizaron para este ensayo controles de sueros de animales previamente cuantificados tanto positivos como negativos. El punto de corte utilizado fue el promedio de DO de los negativos mas dos desviaciones estándar.

TINCIÓN DIRECTA.

Con el objetivo de lograr la observación de micobacterias en las muestras de materia fecal, se realizó la coloración de Ziehl-Neelsen (ZN). La misma usa un colorante concentrado, la fucsina fenicada de Ziehl, posteriormente con el agregado de calor, se tiñen de un color fucsia a las células bacterianas que son resistentes a la decoloración con alcohol ácido (bacilos ácido alcohol resistentes o BAAR); luego se hace actuar al colorante azul de metileno, que logra contrastar y colorear a las bacterias no ácido alcohol resistentes, que se decoloraron previamente. Los BAAR fueron observados en materia fecal (Figura 11).

Esta coloración se llevó a cabo en todas las muestras de leche y materia fecal de los bovinos participantes de este estudio, previo al cultivo bacteriológico, y en todas las colonias desarrolladas en los cultivos. Además, se realizó la coloración del material de superficie presente en aquellos medios de cultivo que no evidenciaron desarrollo de colonias después de los 6 meses de incubación, para definirlos como negativos al cultivo.

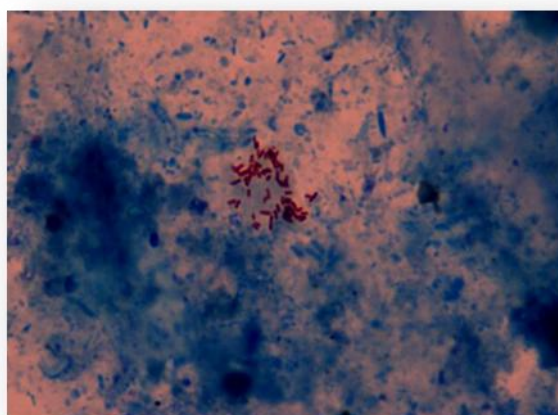


Figura 11: Tinción de Ziehl-Neelsen de extendido de materia fecal bovina 100x.

CULTIVO DE MAP A PARTIR DE MATERIA FECAL.

Se realizó a partir de cada muestra de materia fecal, se procesaron 2 gramos de materia fecal en tubos de 50 mL de capacidad conteniendo 35 mL de agua destilada estéril (tubo de materia fecal). Se agitó vigorosamente por 30 min, se dejó en reposo en posición vertical a temperatura ambiente por un período de 30 minutos para decantar las fibras vegetales en el fondo del tubo. Se tomaron 5 mL del tubo de materia fecal con una pipeta estéril a partir del borde superior de la suspensión y se transfirió a un segundo tubo de plástico cónico de 50 mL de capacidad conteniendo 25 mL de una solución inicial al 0,9% de cloruro de hexadecil piridinio (HPC)). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 18-24 hs, luego se centrifugaron a 900 rpm. durante 30 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el material sedimentado en un mL de solución de antibióticos (ácido nalidíxico, vancomicina y anfotericina B) y se volvieron a incubar a 37°C durante 24 hs. Finalmente se inocularon 200 µL del pellet en tubos con medio de cultivo de Herrold con el agregado de micobactina, estos tubos se incubaron a 37°C durante seis meses, siguiendo el protocolo descrito por Whitlock y col. (1991 y 2000). La utilización del HPC como descontaminante en una concentración final de 0,75% permite inhibir el desarrollo no solo de los gérmenes contaminantes comunes, sino también de otras micobacterias atípicas (Glanemann y col. 2004). La doble incubación con descontaminante y antibióticos, demostró una mayor sensibilidad de detección de Map y una reducción de la contaminación más efectiva (Stabel, 1997).

En el presente trabajo, solamente se cultivaron las muestras analizadas en el medio de Herrold con micobactina (Allied Monitor) para favorecer el desarrollo de Map.

Durante el desarrollo de estos ensayos, además de utilizar el medio de cultivo fraccionado en tubos de vidrio, se prepararon frascos de cultivo CELLSTAR® Standard de poliestireno, libre de metales pesados, de 50 mL de volumen máximo y área de crecimiento de 25 cm³, en cada frasco se agregaron 10 mL de medio de

Herrold y directamente se sembraron 800 μL del sobrenadante de cada muestra problema (Figura 12).

En todos los casos los cultivos fueron observados minuciosamente a partir del primer mes de incubación para detectar la aparición de colonias y evaluar sus características fenotípicas de color y tamaño; para mejorar esta observación se utilizó lupa y luz en una incidencia tangencial a la superficie del cultivo. A partir de la visualización de las colonias se realizaron coloraciones de Ziehl Neelsen para corroborar la presencia de BAAR y su disposición en agregados bacterianos. Se esperó 6 meses de incubación para descartar como negativo a los cultivos.



Figura 12: Frascos de cultivo de 25 cm³ con medio Herrold adicionado con micobactina comercial donde se cultivaron las muestras de materia fecal.

De cada frasco se obtuvieron varias colonias, las cuales se colocaron en tubos con H_2O y se hirvieron, para luego determinar por PCR-IS900 que fueran colonias de Map.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo de Herrold con Micobactina

Componente	Cantidad
Cloruro de sodio	4,5 g
Peptona de carne	9,0 g
Extracto de carne bovina	2,7 g
Piruvato de sodio	4,1 g
Agar	15,3 g
Glicerina	34 ml
Agua destilada	840.9 ml
Yemas de huevo frescas	10 unidades (120 ml)
Verde de Malaquita (solución al 2%)	5.1 ml
Micobactina ₃	2 mg
Antibióticos:	
Anfotericina	50 mg
Ácido nalidíxico	100 mg
Vancomicina	100 mg

Se preparó una solución de Verde de Malaquita al 2% pesando 2 g de colorante (forma oxálica) en 100 mL de agua destilada, luego se fraccionó en tubos con tapa y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Esta solución además de dar color al medio es inhibidora del crecimiento de otras bacterias.

La micobactina se conservó en heladera fraccionada en la cantidad de 2 mg que es suficiente para preparar 1 litro de medio de Herrold, al momento de su uso se disolvió en 1 mL de alcohol etílico 96°.

Los antibióticos se encuentran fraccionados de acuerdo a la dosis y conservados a -20°C y se deben resuspender al momento de su uso. La vancomicina se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril, mientras que el ácido nalidíxico y la anfotericina se suspendieron en alcohol etílico 96°.

Método de preparación:

Se mezclaron por agitación todos los ingredientes (excepto las yemas y el colorante) hasta que se disolvió el agar en un erlenmeyer con capacidad de 2 litros. Se midió el pH y de ser necesario se ajustó a 7,5 con hidróxido de sodio 1N. Luego se esterilizó en autoclave durante 25 min a 120°C y se dejó enfriar a 56°C para agregar las 6 yemas en forma estéril. Luego se mezcló el medio suavemente en un agitador magnético. Se agregó finalmente la solución de Verde de Malaquita con una pipeta estéril y los antibióticos. Se distribuyó asépticamente el medio en los tubos o frascos y se dejó solidificar en posición inclinada. Luego se controló la esterilidad incubando en estufa a 37°C durante 48 hs.

-Solución decontaminante de cloruro de hexadecilpiridinio (CHP)

Cloruro de hexadecilpiridinio	9 g
Caldo cerebro corazón	18.5 g
Agua destilada	1.000 mL

Método de preparación:

Se mezcló por agitación y se fraccionó en frascos un volumen de esta solución de 25 mL. La misma fue esterilizada en autoclave a 120°C durante 20 min. La misma se conserva a temperatura ambiente.

-Mezcla de antibióticos

Anfotericina B	50 mg
Vancomicina	100 mg
Ácido nalidíxico	100 mg
Medio de caldo cerebro corazón al 50%	100 mL

Método de preparación:

El caldo se preparó y se autoclavó a 120°C durante 20 min. Una vez enfriado se le agregaron los antibióticos en cabina de esterilidad. Se fraccionó y congeló hasta su uso.

EXTRACCIÓN DE ADN DE LECHE

A partir de las muestras de leches obtenidas de los tanques de los tambos, en los rodeos en estudio, se realizó la extracción de ADN. Para ello inicialmente se realizó la inactivación de las muestras colocándolas a 70°C durante 60 min y manteniéndolas a -20°C para luego ser utilizadas.

A 50 mL de las muestras se las centrifugó a 3.000 rpm durante 15 min y el pellet de células obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS

Al pellet se le agregó SDS 10% y proteinasa K y se incubó por 40 min a 65°C. Posteriormente fue sometido a 100°C por 10 min y se realizaron dos extracciones, primero con fenol-cloroformo-isoamílico 24:24:1 y otra con cloroformo-isoamílico 24:1. En cada extracción se centrifuga a 12.000 g por 5 min y se recupera la fase acuosa. Luego es precipitado con una solución 5 M de NaCl e isopropanol a -20° durante toda la noche.

El precipitado fue luego lavado con 1 mL etanol 70% y resuspendido en 20 µL de agua. Para la detección por PCR se utilizó la secuencia de inserción IS900, y se utilizó el precipitado con el ADN sin diluir y diluido 1/20.

EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIA FECAL

A partir de las muestras de materia fecal se realizó la extracción de ADN a partir de 1 g de materia fecal que fue resuspendido en PBS/tween 2%, de esta solución se tomaron 1,5 mL que fueron colocados en tubos Fast-Prep con 20 mg de

green buffer (Promega), dNTPs a concentración final de 10 mM (Invitrogen) y agua bidestilada cantidad suficiente para llegar a un volumen final de 25 μ L. El ciclado se realizó en termocicladores convencionales MyCycler (BioRad) y PTC 100 (MJ Research).

Los programas de ciclado fueron acordes a la temperatura de hibridación de los siguientes oligonucleótidos los cuales amplifican la secuencia de inserción IS900.

Primers:

F-5'CCAAACTCCCGACGCGCTGCG3'

R-5'TCGAGGGCCATCACCTCCTTGG3' (Collins y col. 1997).

Programa de amplificación de IS900

	95°C 5 min. -Desnaturalización inicial
30 ciclos	95°C 1 min. -Desnaturalización
	65°C 1 min. -Hibridación
	72°C 1 min. -Extensión
	72°C 1 min. -Extensión final

Luego del ciclado se realizó el sembrado de las muestras en gel de agarosa al 1% para determinar la presencia de los amplicones de peso molecular= 217 pb. (Figura 14).

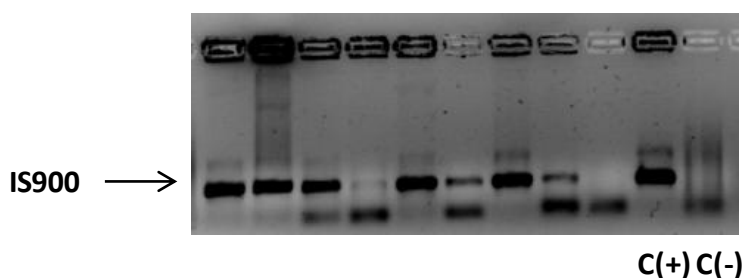


Figura 14: Gel de agarosa al 1% donde se evidencia las amplificaciones de IS900 con los controles correspondientes.

CUANTIFICACIÓN DE MAP MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

A partir del ADN extraído de materia fecal se realizó la cuantificación de Map por PCR en tiempo real construyendo una curva patrón a partir de ADN de cultivo de MAP. Del cultivo se le realizó el recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) para determinar la relación ng ADN/UFC para luego realizar la curva que se utilizó para la cuantificación de las muestras. La misma es necesario realizarla en cada corrida que se realiza debido a que puede variar por el estado de los reactivos.

La mezcla de reacción utilizada contiene el ADN y 10 mM dNTPs, CIMg, Taq Platinum (Invitrogen), Buffer 5x (Invitrogen), SYBR Green (Sigma Aldrich), Rox reference (Invitrogen), Primers Cf=200 ng y agua cantidad suficiente para un volumen final de 20 µL.

Primers:

F-5' AAG ACC GAC GCC AAA GAC 3'

R-5' CAG AGG CTG CAA GTC GTG 3'

La qPCR se realizó en un equipo StepOnePlus de Applied Biosystem.

Programa de amplificación de IS900 qPCR

	95°C 5 min. -Desnaturalización inicial
40 ciclos	95°C 30 seg. -Desnaturalización
	60°C 30 seg. -Hibridación
	72°C 30 seg. -Extensión

Curva de
Melting

95°C 15 seg.
60°C 1 min.
95 15 seg.

Los datos fueron analizados por el programa StepOnePlus V. 2.3 de los cuales se determinó la carga de UFC que tenían cada una de las muestras analizadas.

Para ello se realiza en cada una de las corridas de reacciones de PCR la adición de 6 diluciones sucesivas 1/10 de ADN patrón por duplicado para realizar la curva patrón (Figura 15C), a partir de la cual mediante los resultados obtenidos de cada una de las muestras se determinan los ng de ADN, los cuales se correlacionan con las UFC.

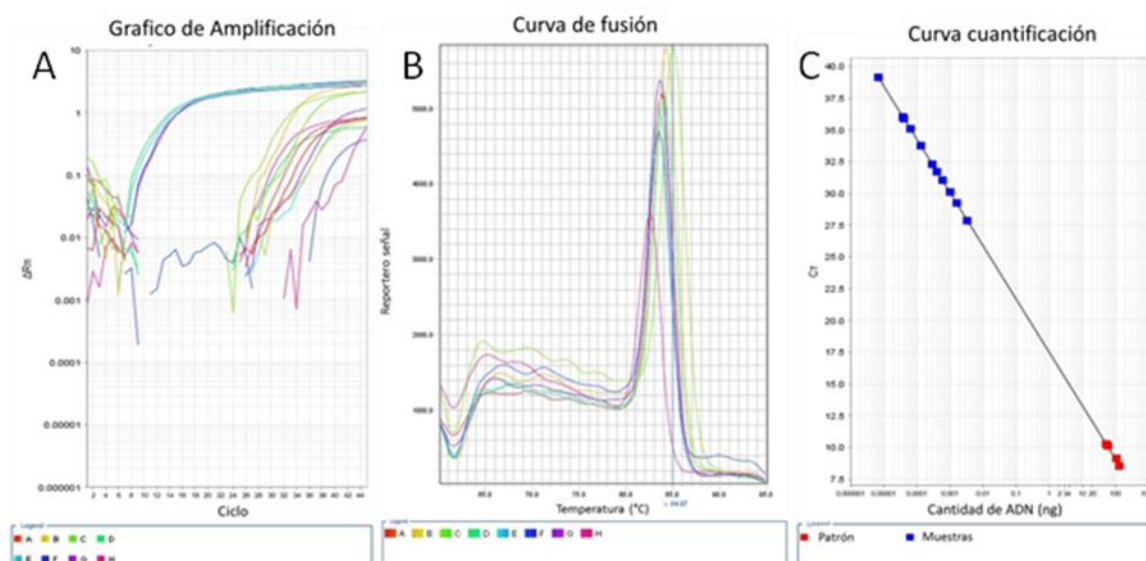


Figura 15: Gráficos PCR en tiempo real donde se observan las curvas de amplificación (A), las curvas de melting (B) y la curva patrón para la cuantificación (C).

DETECCIÓN DE MAP VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MICOBACTERIÓFAGOS

Se trabajó para la puesta a punto de esta técnica con un micobacteriófago TM4 que contiene el gen de una proteína fluorescente roja, *mCherrybomb* (donado por la Dra. Mariana Piuri, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA), para detectar micobacterias viables mediante microscopia de epifluorescencia, el cual actualmente se utiliza para la detección de *M. tuberculosis* a partir de muestras de esputo. Se trabajó con la cepa de Map de referencia (K10) y con muestras pertenecientes a rodeos infectados (materia fecal y leche).

La técnica consiste en incubar la solución del fago con la muestra previamente tratada para luego poder detectar las micobacterias viables que fueron infectadas por el fago que expresan la proteína fluorescente roja mediante microscopía.

Inicialmente se realizó la solución stock del fago a utilizar mediante la infección de *M. smegmatis* con el micobacteriófago, permitiendo que el fago replique en las bacterias, luego fueron plaqueadas en Medio solido 7H10 diferentes diluciones y se observó el crecimiento de las bacterias con playas que generaron los fagos, se seleccionaron las que tenían entre 200 y 300 playas y se les agregó 10 mL de medio liquido 7H9 dejando reposar a 4°C durante 2 hs, para de allí recuperar el fago y realizar el stock, previo filtrado por filtro PES 0.22 µm (Millipore).

Luego se realizaron diluciones seriadas del stock del fago, se infectó *M. Smegmatis* para determinar el título de la misma. En nuestro caso utilizamos un título de 10^8 UFP/mL (Figura 16), ya que en esa placa es la última dilución donde observamos playas.

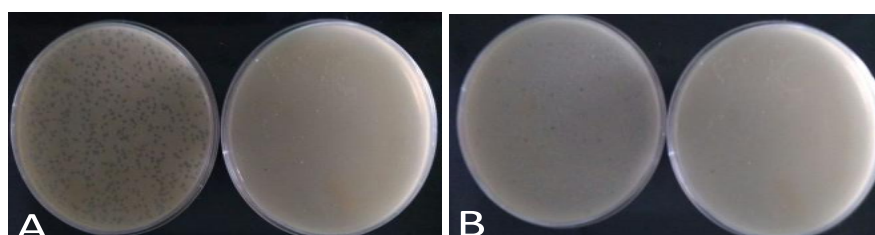


Figura 16: Placas donde se observaron las playas de lisis para determinar la concentración del micobacteriófago realizando diluciones seriadas del mismo. A) 10^{-6} B) 10^{-8} .A-B) A la izquierda se observan las placas infectadas con las diferentes diluciones del fago y a la derecha el control sin infectar de *M. Smegmatis*

Para evaluar la capacidad infectiva del fago, inicialmente se infectaron diluciones seriadas de Map K10 a partir de cultivo desde 10^7 hasta 1 bact./mL con 100 μ L de solución stock de fago 10^8 UFP/mL. Luego, se evaluó la capacidad infectiva del micobacteriófago en muestras de materia fecal infectadas con cultivo de Map K10, concentración final 10^7 bacterias/mL. Para ello se resuspendió 1 gramo de materia fecal en 10 mL de PBS al cual se le agrego el cultivo de K10, se realizaron diluciones seriadas con PBS y de cada dilución se tomaron 500 μ L del sobrenadante, el cual fue infectado con 100 μ L de solución stock del micobacteriófago. Por otro lado, se evaluó la infectividad del mismo, en las mismas condiciones, en muestras de leche. A partir de 50 mL de leche fue centrifugada, el pellet resuspendido en 10 mL de PBS al cual se le agrego el cultivo de K10 para una concentración final de 10^7 bacterias/mL, se realizaron diluciones seriadas y de cada dilución se tomaron con 500 μ L del sobrenadante fueron infectados con 100 μ L el fago. Las diferentes muestras fueron incubadas 6 hs a 37°C y fijadas con paraformaldehido 2%. Las mismas fueron observadas al microscopio de epifluorescencia para determinar la presencia de bacterias infectadas. El mismo protocolo fue utilizado para los controles con muestras de animales sanos (negativos).

ENSAYOS PARA ESTUDIOS DE PERFILES INMUNOLÓGICOS

EVALUACIÓN DE PERFILES DE CITOQUINAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.

PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se empleó el método de centrifugación en gradiente de densidad con *Histopaque 1077* (Sigma Aldrych) utilizando el protocolo estándar del reactivo con algunas modificaciones. Brevemente, la sangre entera se descargó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 1.800 rpm durante 30 min. para poder obtener la capa enriquecida de glóbulos blancos, luego esta fracción fue diluida al medio empleando buffer fosfato (PBS), y se agregó muy despacio por el borde de un tubo cónico de 15 mL conteniendo 3 mL del reactivo Histopaque de manera tal que no se mezclen, a continuación se centrifugó por 30 minutos a 2.100 rpm y se recolectó la capa de células de la interfase, esta población se encuentra enriquecida en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). La capa de células recolectadas fue lavada dos veces con PBS al 2% con suero fetal bovino (SFB) para eliminar los restos de histopaque para luego ser cultivadas en medio RPMI.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

Las CMSP en medio de cultivo RPMI se colocaron en placa de 24 hoyos, 2×10^6 células/hoyo, estimuladas y sin estimular con PPD aviar (derivado proteico purificado de *Maa*) durante un período de 24 h Una vez finalizada la estimulación de las células en las placas, se retiró el medio de cultivo y se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 min para obtener el pellet de células. Las células se resuspendieron en TRIZOL.

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo detallado en el instructivo del TRIZOL comercial (Invitrogen). El ARN obtenido se cuantificó mediante medición en espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*Nanodrop Technologies*) y se evaluó su integridad por corrida en gel de agarosa 0.8%.

Síntesis de ADN copia

Se tomaron 2 µg de ARN total y se trataron con enzima desoxirribonucleasa (*DNAse Amp Grade, Invitrogen*) para eliminar el ADN copurificado con la muestra, el tratamiento con esta enzima se realizó según protocolo estándar, por cada 1 µg de ARN se utilizó 1 µL de enzima y se incubó a temperatura ambiente por 40 min, luego la reacción se interrumpió por el agregado de EDTA 50 mM e incubación a 60°C durante 15 min.

Para la reacción de transcripción reversa se empleó la enzima *SuperScrip II o III* (*Invitrogen*), siguiendo las indicaciones del fabricante, el volumen final de la reacción fue de 20 µL y el templado que se empleó fue de 1 µg de ARN para la reacción positiva y 1 µg para el control negativo (contiene todos los componentes de la reacción excepto la enzima, este control es útil para determinar la existencia de ADN remanente en la muestra de ARN).

El ADNc obtenido de la reacción se probó realizando una PCR convencional utilizando primers que amplifican una secuencia de expresión constitutiva (*gapdh bovino*) con el objetivo de corroborar la ausencia de amplificación en el control negativo y la retrotranscripción del ARN a ADNc en la reacción positiva. Para ello se utilizó 0,125 µL de GoTaq *DNA Polymerase* (Promega), 5 µL del Buffer Green GoTaq, 2 µL dNTPs (2,5 mM de c/u), 0,5 µL de c/u de los primers *gapdh* (300 nM de Forward y Reverse) (Tabla 1) y 2,5 µL del ADNc.

El ciclo de reacción utilizado para GADPH.

	95°C 5 min. --Desnaturalización inicial
30 ciclos	{ 95°C 1 min. -Desnaturalización
	{ 60°C 1 min -Hibridación
	{ 72°C 1 min. -Extensión
	72°C 1 min --Extensión final

PCR EN TIEMPO REAL.

Se utilizó *SYBR green* como método de detección en el equipo pertenecientes a *Applied Biosystems*, el modelo StepOnePlus (*Life Technologies Corporation*).

Las secuencias de los genes bovinos fueron descargadas del sitio NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a partir de estas secuencias se realizó un análisis de los intrones y exones presentes y mediante el empleo del programa provisto por *Applied Biosystems*, *Primer Express 3.0* (*Life technologies corporation*) se diseñaron oligonucleótidos específicos. Una de las características de este programa es que permite la optimización de la búsqueda centrándose en aquellos cebadores que amplifiquen una secuencia pequeña, de cien pares de bases aproximadamente, y que presentan baja interacción entre ellos evitando la formación de dímeros de oligonucleótidos o estructuras tipo horquilla (*hairpins*). Las secuencias de los primer utilizados se muestra en la tabla 1 los cuales fueron previamente evaluados y utilizados en trabajos previos (Blanco y col. 2009).

Gen	Primers		
	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	[nM]
Gapdh	ATCTCTGCACCTTCTGCCGA	GCAGGAGGCATTGCTGACA	300
Pol II	GGACCCGTGTGGACAAGAAT	ACAAGCCCCAGGTAATCATCC	400
IL-2	CGTGCCCAAGGTAAACGCTA	CCATTGAATCCTTGATCTCTCTGG	200
IL-4	TGCCCCAAAGAACACAACCTG	GCACGTGTGGCTCCTGTAGAT	300
IL-8	TCTTGACAGAACTGCAGCTTCAC	ACAAGCCCCAGGTAATCATCC	300
IL-10	GGAAGAGGTGATGCCACAGG	AGGGCAGAAAGCGATGACAG	300
IL-12p35	TAGCCACGAATGAGAGTTGCC	TTTCCAGAAGCCAGACAATGC	200
IL-17	GGACTCTCCACCGCAATGAG	GGTCCACCTTCCCTTCAGC	300
TNFα	CCCCCAGAGGGAAGAGTCC	GGGCTACCGGCTTGTTACTTG	400
IFNγ	AGCTGATTCAAATTCCGGTGG	GATTTTGGCGACAGGTCATTC	250
IL-22	CAAGGCTGGAAAATGGGTTA	GAAGCTAAGTCGGGGGTTTT	135
CXCL 9	AAGGGATGATCCATCCAAAA	CAGGCTTCATTCCCATTCTT	109

Tabla 1: Secuencias y concentración final de reacción (nM) de los oligonucleótidos empleados para la determinación de citoquinas por qRT-PCR.

Controles de contaminación

Con el objetivo de comprobar que la amplificación se produjo solamente a partir del ADNc obtenido del ARN mensajero maduro, se realizaron pruebas agregando ADN bovino genómico (extraído a partir de sangre entera) al ADNc o simplemente empleando al ADN genómico como templado, de esta manera se pudo comprobar que los pares de oligonucleótidos solo amplificaron en presencia del ADNc, debido a

que el diseño de los primers se realizó sobre las secuencias codificantes del gen (exones). En el caso del par de oligonucleótidos diseñados para gapdh se produjo amplificación a partir del ADN genómico, este caso en particular puede explicarse quizás por el hecho de que los genes como gapdh suelen tener múltiples copias dentro del genoma e incluso algunas pueden haber perdido intrones (Coulombe-Huntington & Majewski 2007).

Análisis de resultados

Para el objetivo del trabajo realizado el modelo de cuantificación relativa fue el más adecuado, el mismo permite obtener un resultado de significado biológico sin depender de realizar una curva standard en cada determinación para extrapolar las muestras incógnitas, como es el caso de una cuantificación absoluta. Mediante esta metodología el resultado final proviene de la comparación entre la muestra control y el de tratamiento de interés, entonces el valor numérico corresponde al número de veces (*fold change*) en que varia la expresión de un gen entre ambas condiciones.

Para el análisis de las corridas de PCR en tiempo real se utilizó el software incorporado al equipo step one plus v 2.3. Este programa realiza el cálculo de los resultados de expresión relativa de varios genes a la vez y posibilitan la inclusión de los valores de eficiencia estudiados previamente para cada par de oligonucleótidos, de esta forma también se corrigen las variaciones dadas por las diferencias que puedan existir entre las eficiencias de amplificación de los genes de interés y los genes de referencia.

CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EVALUAR POBLACIONES LINFOCITARIAS.

Para las determinaciones de las poblaciones linfocitarias empleando el citómetro de flujo incubamos $0,5 \times 10^6$ CMSP, estimuladas y sin estimular con PPDA durante un período de 24 hs. Luego de la incubación las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos (AbD serotec, Oxford UK)

para evaluar la expresión de los marcadores de superficie $\gamma\delta\text{TCR}^+\text{WC1}^+$ (MXCA838F, IgG2a), CD4 (MCA 1653^a647, IgG2a), CD8 (MCA837PE, IgG2a), CD25 (MCA2430F y MCA2430PE) y CD21 (MCA5953F, IgG2b)

En el paso de marcación las células se recolectaron de los hoyos de cultivo y se lavarón con PBS y 4% de SFB (*Internegocios*), luego se centrifugaron a 1200 rpm y el *pellet* formado se resuspendió en 100 μL de PBS-SFB, se agrega el anticuerpo diluido en PBS-SFB (20 μL) a razón de 0.5 μL del *stock* por cada $0,5 \times 10^6$ CMSPs y se incubó en oscuridad y a 4°C por un lapso de 40 min. Luego las muestras se centrifugan y las células son lavadas nuevamente. Por último se incuban con un volumen de 500 μL de PBS-paraformaldehído 0,5% (Sigma Aldrich) durante 15 min a 4°C para fijar la marcación, se centrifugó a 1.200 rpm y se resuspendieron en 500 μL de *buffer* FACS flow (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) para ser pasadas por el equipo.

Las células marcadas se analizaron en un citómetro FACScalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) mediante el programa *CellQuest* (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). El grupo de células estudiadas (*gate*) fue el de los linfocitos y la selección se realizó con el programa según los parámetros de tamaño y granularidad (*forward* y *side scatter*) correspondientes.

Se analizó el porcentaje de células que expresaron IL-2R (CD25⁺) dentro de las distintas subpoblaciones WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺. Los porcentajes de IL-2R⁺ fueron calculados como la razón entre las células CD4⁺, CD8⁺ o WC1⁺ CD25⁺ y el total de CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺ o CD21⁺ respectivamente. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó el programa *GraphPad prism 6.0* (San Diego California USA, www.graphpad.com) aplicando el test de Wilcoxon para las comparaciones entre valores de células estimuladas con PPD y sin estimular dentro de un mismo grupo de animales y *Kruskal-Wallis test* para las comparaciones entre los distintos grupos de animales.

GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE MAP MEDIANTE MIRU (UNIDADES REPETITIVAS INTERCALADAS DE MICOBACTERIAS) - VNTR (NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TANDEM)

Para la genotipificación por MIRU-VNTR se utilizaron 8 marcadores diferentes los cuales son específicos para las micobacterias del complejo *Micobacterium avium*, estos fueron descritos y diseñados por Thibault y col., VNTR292, MIRUX3, VNTR25, VNTR47, VNTR3, VNTR7, VNTR10 y VNTR32. Cada uno de los primers fue marcado con fluorocromos (tabla 2) para luego ser analizados.

ión de los primers en el genoma de			Tamaño del		Primers 5'-3'		Buffer Utilizado		
TR.N°	Producto de PCR (pb)					Tm (°C)	1µl	5µl	Marca
	Inicio	Final		Directo	Reverso		DMSO	Betaína	Fluorocromo
292	3253590	3253889	300	CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	GCTGTATGAGGAAGTCTATTCATGG	58	+	-	FAM
X3	4441875	4442070	196	AACGAGAGGAAGAAGTAAAGCCG	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG	58	-	-	VIC
25	3665598	3665947	350	GTCAAGGGATCGGCGAGG	TGGACTTGAGCACGGTCAT	58	+	-	NED
47	4128604	4128821	217	CGTTGCGATTTCTGCGTAGC	GGTGATGGTCGTGGTCATCC	64	+	-	PET
3	131320	131527	208	CATATCTGGCATGGCTCCAG	ATCGTGTTGACCCCAAGAAAAT	60	+	-	FAM
7	3711417	3711619	203	GACAACGAAACCTACCTCGTC	GTGAGCTGGCGGCGCTAAC	60	+	-	VIC
10	4279553	4279855	303	GACGAGCAGCTGTCCGAG	GAGAGCGTGGCCATCGAG	60	-	+	NED
32	1125707	1126004	298	CCACAGGGTTTTTGGTGAAG	GGAAATCCAACAGCAAGGAC	55	+	+	PET

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la determinación de MIRU-VNTRs, tamaño del amplicon, secuencia de directo y reverso, temperatura del melting, *buffer* utilizado y fluoróforo que se indica en la última columna.

La mezcla de amplificación contiene *buffer* 1x (10 mM Tris-HCl pH 9; 50 mM KCl and 0.1% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂), 0.02 mM dNTP, 1 uM *primers* y 0.25 U Taq Plus (INBIO), suplementado con betaína, DMSO y MgCl₂, en un volumen final de 25 µL.

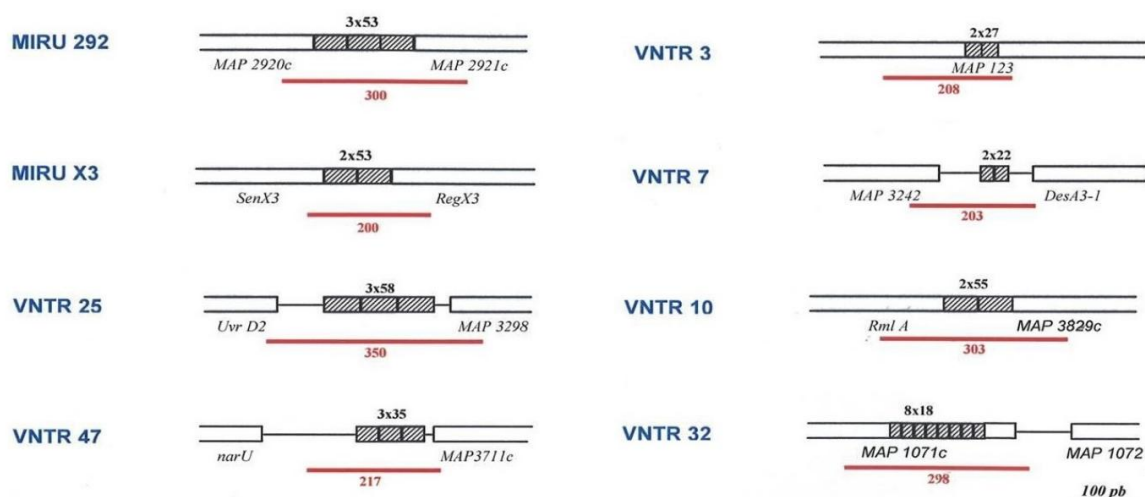


Figura 17: Representación esquemática de las diferentes secuencias pertenecientes a los MIRUs, respecto a la cepa de referencia de MAP K10.

Los productos de cada amplificación (Figura 17) fueron cuantificados y analizada su fluorescencia mediante electroforesis capilar, cuyo resultado fue luego analizado mediante el *software GeneMapper*. Los patrones tomados como referencia fueron los provenientes de la amplificación de la cepa Map K10, INMV2. El perfil numérico INMV que tomamos como referencia es el publicado en la base de datos (INRA, Nouzilly, MIRU-VNTR) <http://mac-inmv.tours.inra.fr/>

PODER DE DISCRIMINACIÓN

La diversidad alélica (D) para los diferentes locus utilizados para MIRU-VNTR se determinó usando el índice de discriminación de Hunder y Gaston.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j (x_j - 1)$$

Donde N es el número total de aislamientos genotipificados, s es el número de subtipos diferentes discriminados por el método y x_j es el número de aislamientos diferenciados.

El índice (D y HGDI) fue calculado utilizando un software http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/, de la Universidad de la ciudad de Basque.

Las relaciones entre los diferentes patrones INMV pueden mostrarse en un Dendograma y los patrones de descendencia evolutiva entre el perfil alélico (relación clonal) se puede deducir mediante el algoritmo goe-BURST. Se supone que la distancia genética entre dos patrones de INMV es proporcional a la diferencia en número de repeticiones de cada uno de los locus.

El algoritmo eBURST descrito fue inicialmente basado en MLST pero luego sustituido por estudios MLVA. El algoritmo goe-BURST (goeburst.phyloviz.net/) (Francisco y col. 2009), usa el mismo patrón para agrupar que eBURST pero provee una solución global óptima, para determinar la relación entre los perfiles obtenidos. Los complejos clónales fueron definidos por MIRU-VNTR agrupados por SLVs. Estos algoritmos fueron realizados mediante el software Phyloviz <http://www.phyloviz.net/>.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

PRIMERA PARTE

EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LOS ANIMALES DE LOS RODEOS EN ESTUDIO

En el presente capítulo se enumeran los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas utilizadas para evaluar respuesta celular, respuesta humoral y las diferentes técnicas para identificar la presencia de Map en las muestras clínicas obtenidas en los animales de los rodeos en estudio.

RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO DE MADRES PERTENECIENTES A LOS RODEOS EN ESTUDIO

RODEO DE BAJA PREVALENCIA

Con el fin de analizar a las madres del rodeo de baja prevalencia y realizar una caracterización de las condiciones generales del mismo se realizaron las técnicas de ELISA, PCR IS900 y liberación de interferón gama (IFN- γ) (Tabla 3), los resultados que se muestran en la misma pertenecen a las vacas madres de los terneros muestreados posteriormente.

Animal	año de nacimiento	IDR-PPDA	ELISA	AGID	PCR IS900	IFN γ
5002	2008	N/D	-	N/D	+	-
5019	2008	N/D	+	N/D	-	-
5023	2008	N/D	-	N/D	-	-
5053	2008	N/D	-	N/D	-	-
5103	2008	N/D	-	N/D	-	-
5148	2009	N/D	-	N/D	-	-
5175	2009	N/D	-	N/D	-	-
5186	2010	N/D	+	N/D	-	-

Tabla.3: Resultados de pruebas diagnósticas realizadas a madres pertenecientes al RBP.

En el RBP se calculó la prevalencia aparente en base a la serología dando como resultado un 2,5 %, estimando la prevalencia real del 10% la cual se

cuadruplica calculada en base a la sensibilidad del ELISA que tiene valores entre un 25-30% aproximado con una especificidad de 97-98%.

RODEO DE ALTA PREVALENCIA

En el presente rodeo se caracterizaron a las madres mediante el test de ELISA, el ensayo de liberación de IFN- γ , IDR-PPDA, AGID y cultivo.

Los resultados se muestran en la tabla 4, se puede observar que el 92 % de los animales muestreados presentaron resultado positivo a alguna de las pruebas diagnósticas realizadas. El 46 % de los animales resultó positivo frente al cultivo de Map en medio sólido, confirmados mediante PCR IS900 (Tabla 4), los resultados mostrados corresponden a vacas madres de los terneros muestreados posteriormente. La prevalencia real del establecimiento fue del 30% determinada mediante cultivo de materia fecal.

Animal	año de nacimiento	IDR-PPDA	ELISA	AGID	CULTIVO	IFN γ
543	2005	+	+	N/D	+	+
A023	2007	-	-	+	-	-
A029	2007	+	-	N/D	+	-
A049	2007	+	-	N/D	-	-
A083	2008	-	+	N/D	-	-
A126	2008	-	-	N/D	+	-
A171	2009	+	-	N/D	+	-
A222	2010	+	+	N/D	+	+
A225	2010	-	-	+	N/D	-
A329	2011	+	-	N/D	-	-
A340	2011	+	-	N/D	-	-
A344	2011	-	-	N/D	+	-
A354	2011	-	-	N/D	N/D	-

Tabla.4: Resultados de pruebas diagnósticas realizadas a madres pertenecientes al RAP.

A los mismos animales se les tomaron muestras de sangre periférica para evaluar las diferentes subpoblaciones linfocitarias con el fin de poner a punto la técnica y determinar si la viabilidad de las células se veía afectada debido al tiempo que transcurría entre el sangrado y el procesamiento de las muestras (12 hs tiempo entre sangrado en Tandil y procesamiento en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar). Se pudo concluir en base a los resultados obtenidos que la viabilidad de las células no se veía afectada, luego de realizar la extracción del paquete de blancos, cultivarlas en estufa de CO₂ en medio RPMI y estimularlas con el purificado proteico PPDA por 18 hs sin ver afectada la viabilidad.

En base a estos ensayos pudimos determinar que los animales muestreados presentaron activación de LT WC1⁺CD25⁺ frente al estímulo, observándose un aumento con diferencias significativas en el porcentaje de las mismas con respecto a los linfocitos sin estimular (Figura 18 A). En el caso de las poblaciones de LT CD4⁺CD25⁺ y CD8⁺CD25⁺, se observó un aumento en el porcentaje de células luego del estímulo sin ser el mismo estadísticamente significativo con respecto a la población en los linfocitos no estimulados (Figura 18 B C).

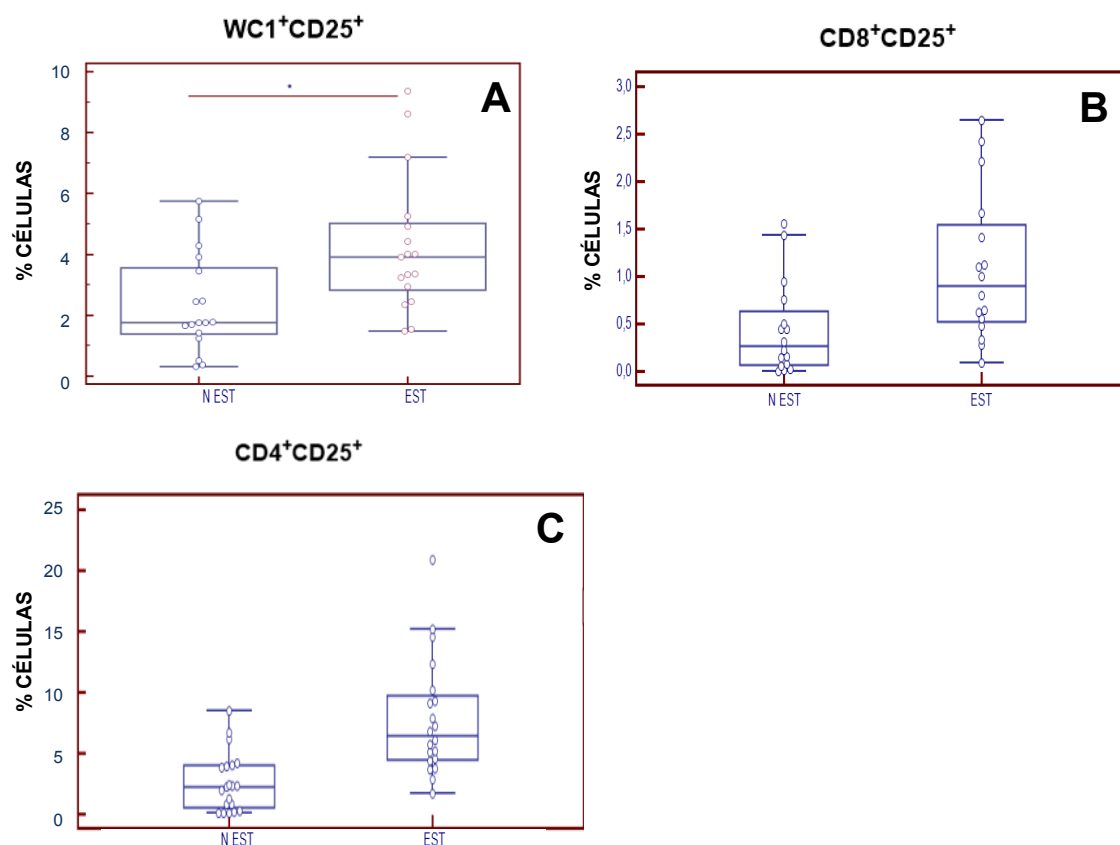


Figura 18: Resultados de la determinación de los porcentajes de LT activados presentes en sangre periférica de bovinos adultos del RAP, los datos fueron analizados mediante el T-test de dos variables ($p < 0.05$).

En base a estos resultados podemos concluir que las condiciones utilizadas son aptas para el desarrollo de la técnica para determinar los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de LT.

Los resultados observados en las madres de los diferentes rodeos serán luego analizados frente al resultado obtenido de los terneros que son el objeto de estudio del presente trabajo.

DETECCION DE MAP EN TANQUES DE LECHE

Se realizó la extracción de ADN de muestras de leche en los diferentes tiempos de muestreo para la detección de Map mediante PCR IS900 en los mismos. Los resultados de estas extracciones fueron para todos los tiempos negativos. No fue posible detectar a Map en leche de tanque.

RESULTADOS DE DIAGNÓSTICOS DE TERNEROS PERTENECIENTES A LOS RODEOS EN ESTUDIO.

En base a los objetivos del presente trabajo se aplicaron diferentes técnicas diagnósticas y se caracterizó la respuesta inmune de los terneros incluidos en el presente estudio.

Para ello se muestrearon 13 terneras pertenecientes al RAP, 8 terneras pertenecientes al RBP y 8 terneras pertenecientes al rodeo negativo. Los mismos fueron seleccionados debido a que pertenecieron a la parición 2014 de los establecimientos seleccionados.

RESPUESTA CELULAR

LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA MEDIANTE ELISA.

Al evaluar la respuesta celular, a partir de la liberación de interferón gamma producida por los linfocitos estimulados, de los diferentes grupos de animales se pudo observar que hasta los 16 meses ninguno de los mismos presentó esta respuesta celular (Figura 19 y 20).

El grupo de animales del RAP (rodeo con alta prevalencia) comienza a tener niveles altos de liberación de interferón gamma en respuesta a PPDA a los 18-20 meses (Figura 19).

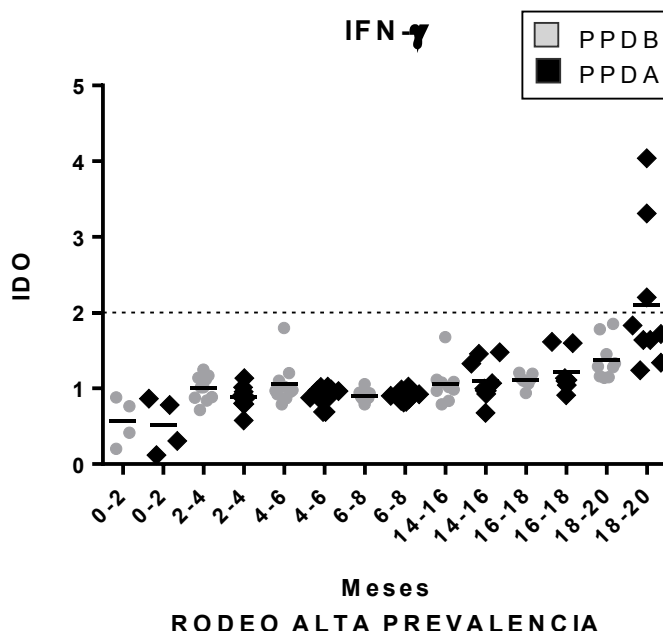


Figura 19: Cuantificación de IFN-γ (BOVIGAM), en el RAP, valor de corte establecido IDO=2.

De los datos obtenidos pudimos establecer que 3 de los animales del RAP resultaron positivos frente a la estimulación con PPDA en el ELISA que mide la liberación de IFN-γ encontrándose por encima de la línea de corte (Punto de corte del IDO=2, relación en PPDs/PBS), estos fueron los animales A578, A596 y A597, aclarando que ninguno de ellos presentó valores positivos cuando se realizó la estimulación con PPDB (Figura 19).

Cuando realizamos el ensayo en el RBP (rodeo de baja prevalencia) pudimos evidenciar que ninguno de los animales presentó liberación de interferón gamma cuantificable mediante la técnica de ELISA, luego de la estimulación de los linfocitos tanto con PPDA, con PPDB se observó que un animal presentó valores positivos a los dos meses (Figura 20).

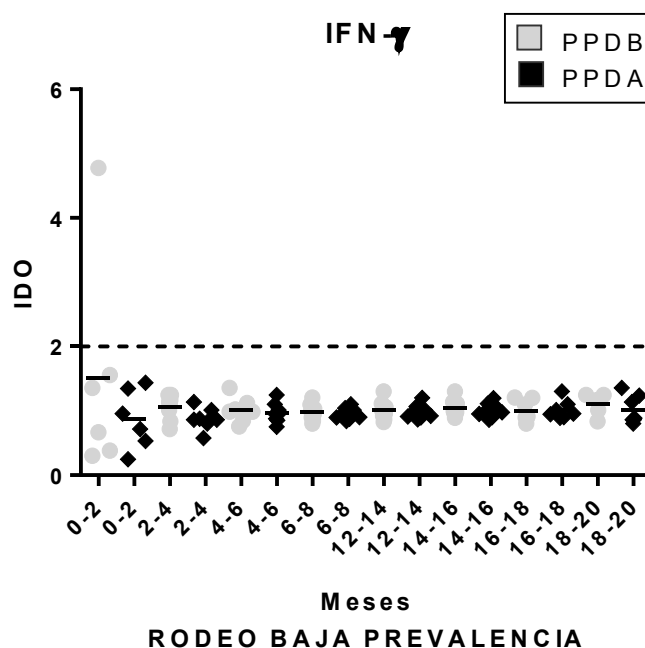


Figura 20: Cuantificación de IFN- γ (BOVIGAM), del RBP, valor de corte establecido por el comerciante IDO(x/PBS)=2.

Mediante los datos obtenidos podemos observar una concordancia con la bibliografía que existe sobre respuesta celular medida como liberación de IFN- γ en los animales con paratuberculosis, en los cuales se destaca que la misma tiene un aumento aproximadamente a los 2 años de contraída la infección, cuando finaliza la etapa subclínica de la enfermedad.

Los resultados pertenecientes al rodeo negativo no son mostrados ya que los mismos resultaron negativos.

RESPUESTA AL ENSAYO DE INTRADERMOREACCIÓN CON PPDA

La realización de esta prueba se efectuó a la edad de 20 meses de los animales del estudio para que la misma no afecte el desarrollo del resto de los

ensayos diagnósticos que se realizaron en las edades tempranas de estos animales en los diferentes rodeos en estudio, además se sabe por estudios previos que la misma altera la respuesta inmune, por ejemplo estimulando las células productoras de IFN- γ (Stabel y col. 2007).

Se pudo observar que solamente tres de los animales a los 20 meses presentó reacción positiva a la misma, A595, A596, A597. (Tabla 5)(Figura 21)

Nro de Caravana	A578	A579	A581	A582	A583	A584	A587	A588	A590	A591	A592	A593	A595	A596	A597	A599
LECTURA PPD (en mm)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1	9	3	Neg

Tabla 5: Resultados a la intradermorreacción con PPDA en el pliegue ano caudal de los animales en el rodeo con alta prevalencia a los 20 meses de edad.

A596 (9 mm)



Figura 21: Animal con respuesta a intradermorreacción (IDR) PPDA, en RAP.

De esta forma cuando comparamos los resultados de estas dos pruebas, IFN- γ e IDR, que evalúan respuesta celular, estos dos animales se correlacionan. A596 y A597, resultaron positivos a ambas pruebas.

En el caso del RBP y el RN los animales no presentaron aumento luego de la inoculación.

RESPUESTA HUMORAL

CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IGG TOTALES MEDIANTE ELISA

En este ensayo se realizó la cuantificación de anticuerpos de Map con dos antígenos diferentes, el antígeno que contiene todos los componentes de la bacteria, incluido los lípidos (WA) producido de la cepa D4ER de *M. avium* y el antígeno protoplasmático de paratuberculosis PPA-3 comercial producido por Allied Monitor, a partir de una cepa de Map.

Se pudo observar que los títulos que se obtienen con el antígeno WA tienen mayor valor que cuando utilizamos el antígeno PPA-3.

En cuanto a la respuesta humoral cuantificada mediante ELISA se pudo observar que con el ELISA-WA el RAP presentó niveles positivos de anticuerpos a partir de los 8 meses de edad, y con el ELISA-PPA-3 a partir de los 12 meses. En cambio en RBP se pudo evidenciar que los animales presentaron títulos positivos recién a los

16 meses de edad con ambos ELISAs (Figura 22).

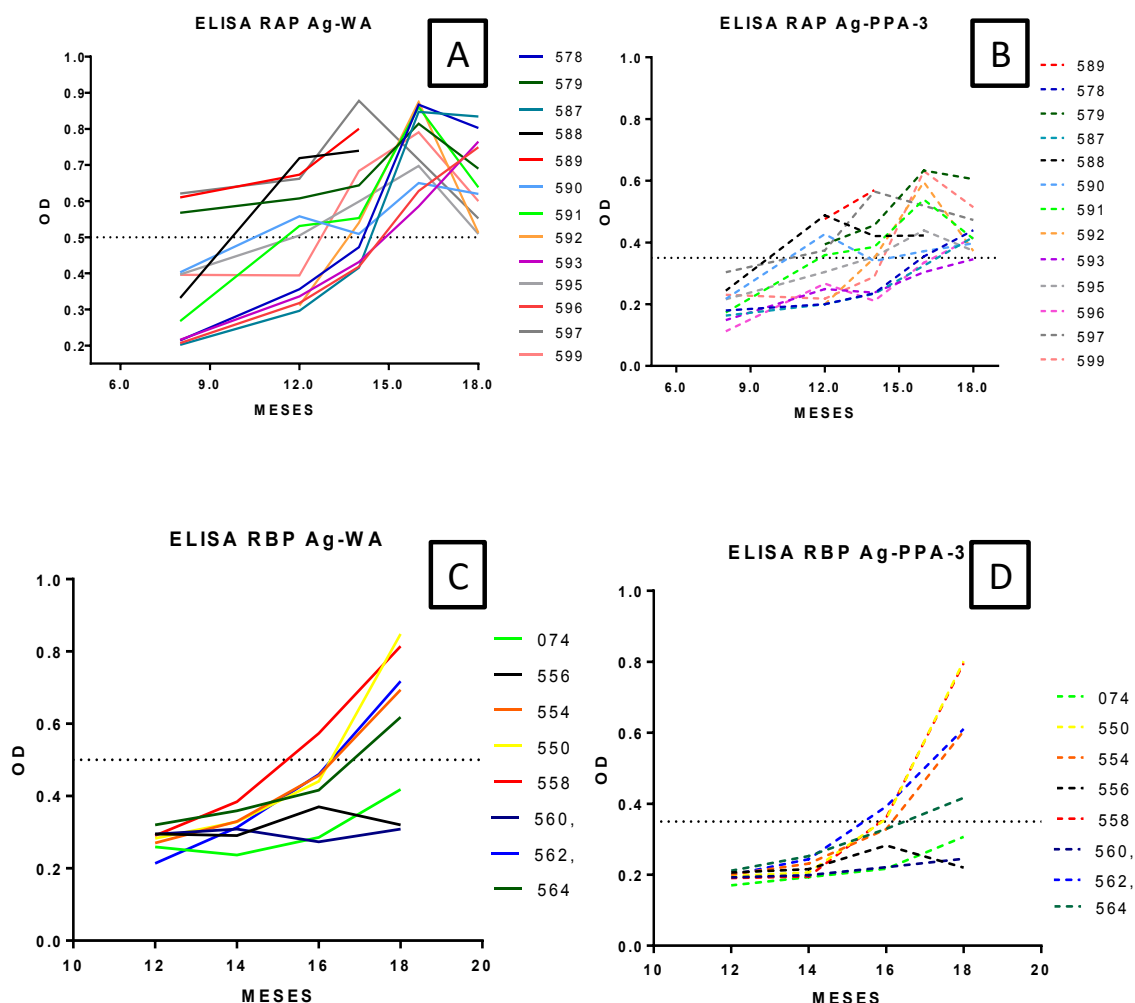


Figura 22: Títulos de anticuerpos de cada uno de los animales muestreados en A) RAP evaluado con el antígeno WA. B) RAP evaluado con el antígeno PPA-3 C) RBP evaluado con el antígeno WA D) RBP evaluado con el antígeno PPA-3.

Se pudo observar en el RAP que el 80% de los animales a los 12 meses presentaron títulos de anticuerpos frente a Map, y el 100% a los 18 meses (Figura 22 A B), confirmando que los mismos tuvieron contacto con micobacterias, lo cual está en concordancia con el estado sanitario del rodeo y el diagnóstico de los adultos, ya que el 40% de ellas presentaron cultivo positivo.

En cambio en el RBP se evidenció un bajo porcentaje de animales que presentaron anticuerpos frente a Map, y esto se evidenció recién entre los 16 y 18

meses de edad cuando algunos animales comenzaron con títulos de anticuerpos considerados positivos, los cuales no superaron el 50% de los animales en seguimiento (Figura 22 C-D).

CUANTIFICACIÓN DE ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE ELISA CON EL ANTÍGENO PPA-3.

En este ensayo se realizó la cuantificación de isotipos IgG1 e IgG2 con el antígeno protoplasmático PPA-3 comercial de Allied Monitor.

Se pudo observar que en dos de los animales del RBP y 2 animales del RAP en los que se evidenció aumentos en IgG totales también se observaron aumentos del isotipo IgG1 a los 16 meses. A los 18 meses se observa una disminución de IgG1 en los animales muestreados de los rodeos infectados (Figura 23 A B).

En otros tiempos en el RAP se puede observar que solo un animal presentó niveles de anticuerpos IgG1 a los 8 meses de edad, presentando casi el 80 % de los animales niveles por debajo de la línea de corte. A los 12 meses se observa que el 30 % de los animales presentaron niveles del isotipo igG1 por encima de la línea de corte (Figura 23 B) disminuyendo a 0 % en el muestreo siguiente y a los 16 meses solamente dos animales (15%) presentan este isotipo. Y nuevamente disminuye a 0% a los 18 meses.

Como puede observarse en la figura 23 la presencia e una respuesta inmune asociada al isotipo IgG1 presentó gran variabilidad a lo largo del ensayo.

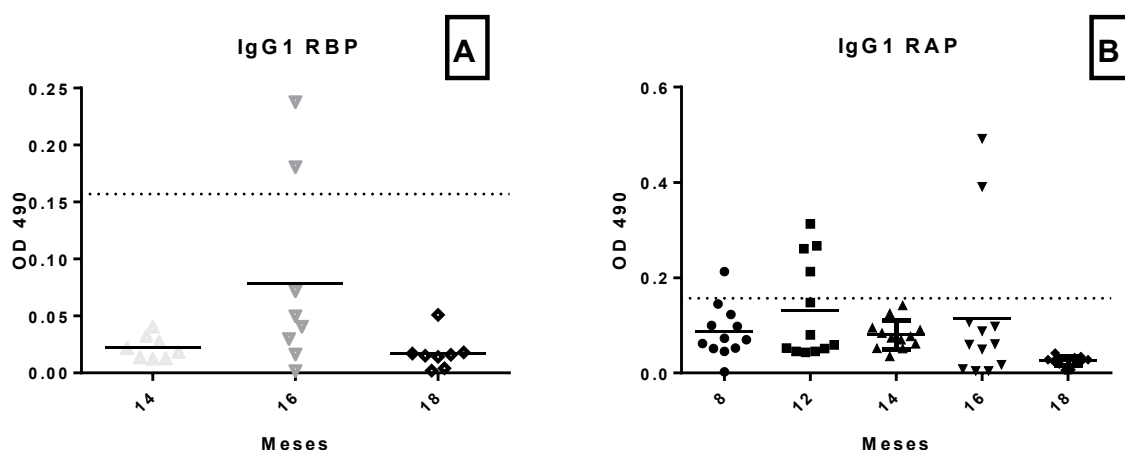


Figura 23: Resultados de anticuerpos isotipo IgG1 de los rodeos en estudio a los diferentes tiempos A) rodeo con baja prevalencia B) rodeo con alta prevalencia.

Cuando evaluamos los isotipos IgG2 pudimos observar que el RBP no presentó niveles sobre la línea de corte hasta los 16 meses donde se observa que dos animales (25 %) presentan un aumento de este isotipo (Figura 24 A) y uno de los animales a los 18 meses.

En el caso de RAP se pudo observar que un 23 % de los animales presentaron anticuerpos isotipo IgG2 a los 8 meses, un 23 % a los 16 meses y un 30 % a los 18 meses (Figura 24 B). Estos niveles de IgG2 observados en el RAP fueron mayores que los observados en el RBP.

Como se puede observar en el RAP el isotipo IgG2 (asociado con respuesta celular) presentó un comportamiento menos variable que el isotipo IgG1. Este aumento del isotipo IgG2 a los 18 meses podría estar asociado a una respuesta celular que se observó en la figura 19 con la presencia de un aumento de IFN- γ a los 18-20 meses en este rodeo y además de un aumento de la IDR (Tabla 5).

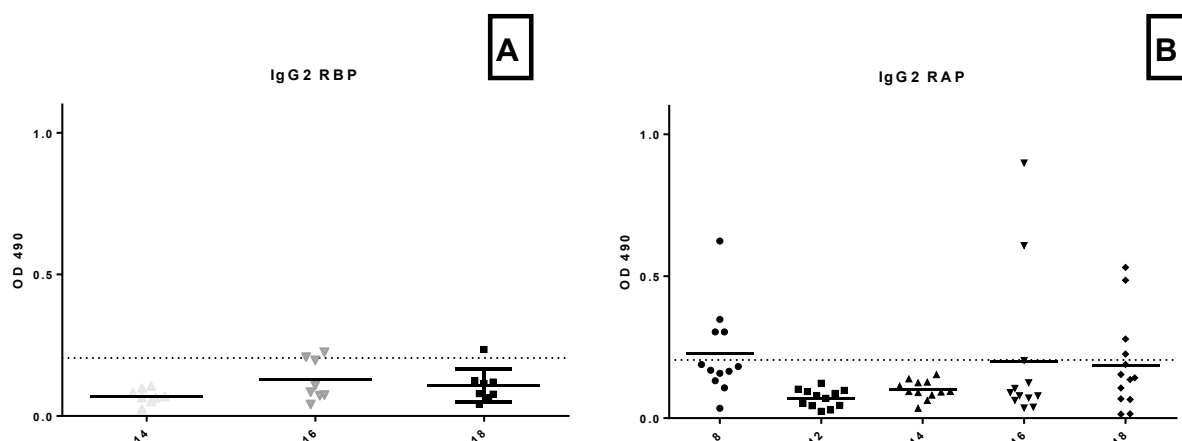


Figura 24: Resultados de anticuerpos isotipo IgG2 de los rodeos en estudio a los diferentes tiempos A) rodeo con baja prevalencia B) rodeo con alta prevalencia.

DIAGNÓSTICO DIRECTO

DIAGNÓSTICO MEDIANTE CULTIVO DE MATERIA FECAL.

El cultivo es considerado la prueba de oro para el diagnóstico de paratuberculosis, presentando las limitaciones de contar con pasos de decontaminación en los cuales podemos afectar a la viabilidad de las micobacteria presentes. De los cultivos sólidos realizados en los muestreos, a los 14 meses uno de los animales, 589, perteneciente al RAP resultó positivo, cultivado en medio HEYM. Este animal resultó negativo a las pruebas que miden respuesta celular pero tuvo altos niveles de anticuerpos, por lo tanto podría especularse que es uno de los animales que desarrolla rápidamente la infección sin respuesta celular protectora, este animal a los 15 meses presento diarrea crónica y murió.

DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR/PCR EN TIEMPO REAL.

A partir de ADN extraído de muestras de materia fecal se realizó PCR de la secuencia IS900. Los resultados confirman que 7 animales presentaban excreción de Map por heces a diferentes tiempos a partir de los 14 meses de edad, todos los animales pertenecientes al RAP. Cuando realizamos la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de Map en las muestras, se pudo observar que las mismas contenían una baja carga bacteriana, entre 1.700-200.000 bacterias por gramo de materia fecal, lo cual logró cuantificarse en 4 animales a los 20 meses de edad (Tabla 6). También se observó que hay animales en los cuales se detectó liberación de Map en materia fecal pero luego los mismos no volvieron a excretarla, esto podría estar asociado a que hay animales que son excretores pasivos que no están infectados (Sweeney y col. 1992) o que la carga que eliminan es baja y debido a los métodos de extracción de ADN no logramos detectarla.

PCR (UFC)	14 meses	16 meses	18 meses	20 meses
A578	-	-	-	-
A579	+	-	-	-
A580	-	-	-	-
A587	-	-	-	1.7x10 ³
A589	+	N/D	N/D	N/D
A590	-	-	-	-
A591	+	+	-	5x10 ⁴
A592	-	-	-	-
A593	-	-	-	2x10 ⁵
A595	-	-	-	-
A596	-	+	-	-
A597	-	-	-	2.2x10 ³
A599	+	+	-	-

Tabla 6: Resultados de qPCR, en muestras de materia fecal. Informamos como positivas (+) y negativas (-) los resultados por PCR convencional y en los que dieron positivo a la qPCR se indica la cuantificación (UFC/g. MF.).

Cabe destacar que los animales que en respuesta celular solo dieron una de las dos pruebas (IFN-γ e IDR), el animal A578 que tuvo solo elevados niveles de IFN-γ y el animal A595 que tuvo sólo IDR positiva no dieron positivos a la PCR en

materia fecal, mientras que los animales A596 y A597 (ambos de madre positiva) que dieron ambas pruebas de la inmunidad celular positivas excretaron Map por materia fecal. Ambos animales además de presentar respuesta celular, detección de Map por PCR tienen altos títulos de anticuerpos, estos animales serán seleccionados en el apartado de respuesta inmune para individualizar su respuesta. El animal A589 cultivo positivo también dio positiva la PCR confirmando la identidad de Map de la micobacteria aislada en cultivo. Este animal murió tempranamente y no pudo seguir evaluándose en este estudio.

DIAGNÓSTICO DIRECTO MEDIANTE TINCION DE Ziehl-Neelsen

Se pudo observar en algunas de las muestras de materia fecal la presencia de micobacterias a partir de los 10 meses utilizando la tinción de ZN (Figura 25). Con el fin de confirmar que se trataba de Map posteriormente se han realizado técnicas moleculares.

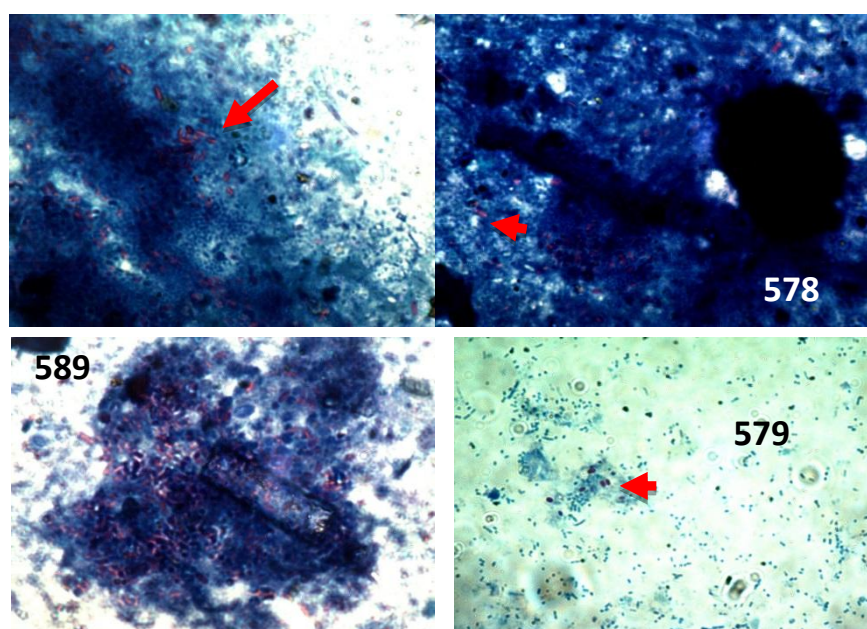


Figura 25: Microscopía óptica 100x, tinción de Ziehl-Neelsen, en donde se observa presencia de micobacterias acido-alcohol resistentes.

Si comparamos los resultados de ZN con la PCR vemos que esta técnica puede tener una baja sensibilidad y especificidad ya que solo es capaz de detectar micobacterias ácido alcohol resistentes en el animal A589 que se infectó tempranamente y fue cultivo positivo y en el animal A579 que ambos se confirmaron mediante PCR y el animal A578 que no fue posible confirmar la presencia de Map por PCR pero fue uno de los animales que presentó diarrea intermitente a los 16 meses.

DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS VIABLES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE FAGOS

En el presente trabajo se realizó la puesta a punto de la utilización de un micobacteriófago marcado con una proteína fluorescente roja (*cherry-bomb*) para la detección de micobacterias viables en materia fecal y leche.

Para evaluar la capacidad infectiva del fago, se infectaron diluciones seriadas de Map K10 a partir de cultivo desde 10^7 hasta 1 bact/mL con 100 μ L de solución stock de fago, obteniéndose una capacidad detectable de hasta 10 micobacterias (Tabla 7). Luego se evaluó la capacidad infectiva del micobacteriófago en muestras de materia fecal y en muestras de leche. Estas muestras se infectaron con cultivos con diferentes concentraciones de Map K10 (tabla 7).

Concentración de Bacterias/ml.	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10
Cultivo K10	+	+	+	+	+	+	+
M. Fecal	+	+	+	-	-	-	-

Tabla 7: Resultados de observaciones microscópicas para evaluar la presencia de bacterias que expresaron la proteína *cherry-bomb*, tanto a partir de cultivo como en

muestras de materia fecal experimentalmente infectadas con diluciones seriadas de Map K10.

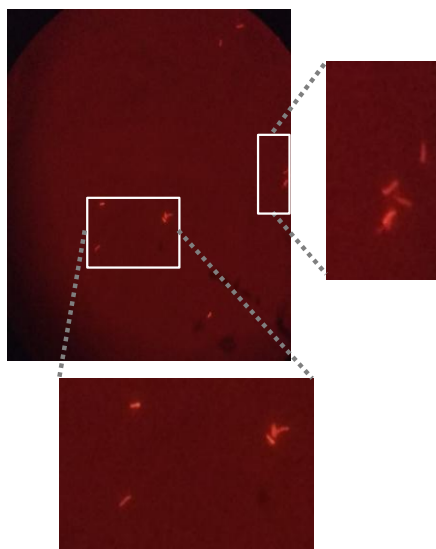


Figura 26: Imagen 100x Microscopio de epifluorescencia. Muestras de cultivo de K10 10^5 bact./mL infectado con el micobacteriófago detectándose la expresión de la proteína fluorescente roja, *cherry-bomb*.

Como resultado de los ensayos realizados se observó que los fagos infectan y permiten la detección de Map viables evidenciada por microscopia de epifluorescencia (Figura 26). A partir de cultivo presentó una sensibilidad de 10 bact./mL y en materia fecal el mismo presentó una sensibilidad de 10^5 bact./mL (tabla 7), esta disminución en la sensibilidad de la técnica se puede deber a la presencia de inhibidores provenientes de la muestra observándose además la presencia de fluorescencia inespecífica. Por otro lado, no pudo observarse fluorescencia en las muestras de leche, posiblemente sea necesario optimizar las condiciones para la detección de micobacterias en muestras de leche. Estos resultados son alentadores para muestras de materia fecal permitiendo la determinación rápida de micobacterias mediante la infección con micobacteriófagos fluorescentes en muestras de bovinos, permitiendo desarrollarlo como un posible método diagnóstico de Map viables de forma rápida.

EVALUACIÓN DEL ESTADO GENERAL DE LOS ANIMALES Y SINTOMATOLOGÍA DE LOS RODEOS EN SEGUIMIENTO

En base a las observaciones realizadas en cada uno de los muestreos realizados en los establecimientos se realizó la siguiente tabla teniendo en cuenta la sintomatología de los animales en estudio.

Meses	2	4	6	8	10	12	16	18
RBP	-	-	-	-	-	-	-	-
RAP	-	-	-	-	-	-	DI	DI

Tabla 8: Identificación de sintomatología mediante observaciones, DI: diarrea intermitente.

Se pudo observar que en el RAP los animales presentaron diarrea intermitente desde los 16 meses de edad asociada con la presencia de BAAR en los animales A578, A591 y A596. También presentó diarrea crónica el animal A589 que murió. En el caso del RBP no se observó ninguna sintomatología. (Tabla 8)

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO EN RAP Y RBP.

Rodeo baja prevalencia.

Meses	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cultivo MF	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
BAAR	-	-	-	-	N/D	-	-	-	-	-
IFN-gamma	-	-	-	-	N/D	-	-	-	-	-
ELISA PPA-3	-	-	-	-	N/D	-	-	+(n=4)	+(n=5)	+(n=5)
ELISA WA	-	-	-	-	N/D	-	-	+(n=4)	+(n=5)	+(n=5)
PCR tf	-	-	-	-	N/D	-	-	-	-	-
qPCR	-	-	-	-	N/D	-	-	-	-	-

Tabla 9: Resultados globales en el RBP, en cada casillero en los casos de animales positivos se indica la cantidad de los mismos (n).

Animal	año de nacimiento	DR-PPDA	ELISA PPA3	ELISA WA	CULTIVO	IFN γ	PCR IS900	IgG2	IgG1
74	2014	-	-	-	-	-	-	-	-
550	2014	-	+	+	-	-	-	-	-
554	2014	-	+	+	-	-	-	-	-
556	2014	-	-	-	-	-	-	-	-
558	2014	-	+	+	-	-	-	+	+
560	2014	-	-	-	-	-	-	+	+
562	2014	-	+	+	-	-	-	+	-
564	2014		+	+	-	-	-	-	-

Tabla 10: Resultados individuales en el RBP.

Rodeo Alta prevalencia.

Meses	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cultivo MF	N/D	N/D	-	-	-	N/D	+(n=1)	-	-	-
BAAR	-	-	-	-	+(n=3)	N/D	+(n=2)	+(n=2)	+(n=3)	+(n=3)
IFN-gamma	-	-	-	-	-	N/D	-	-	-	+(n=3)
ELISA PPA-3	-	-	-	-	+(n=1)	N/D	+(n=9)	+(n=6)	+(n=13)	+(n=12)
ELISA WA	-	-	-	+(n=3)	+(n=4)	N/D	+(n=8)	+(n=10)	+(n=13)	+(n=12)
PCR tf	-	-	-	-	-	N/D	+(n=4)	+(n=3)	-	+(n=4)
qPCR	-	-	-	-	-	N/D	N/D	+(n=3)	-	+(n=4)

Tabla 11: Resultados globales en el RAP, en cada casillero en los casos de animales positivos se indica la cantidad de los mismos (n).

Animal	año de nacimiento	IDR-PPDA	ELISA PPA3	ELISA WA	CULTIVO	IFN γ	PCR IS900	IgG2	IgG1	ZN	DIARREA
A578*	2014	-	+	+	-	+	-	+	-	X	X
A579*	2014	-	+	+	-	-	+	-	-	X	-
A580	2014	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A587	2014	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
A589	2014	-	+	+	+	-	+	-	+	X	X
A590	2014	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
A591	2014	-	+	+	-	-	+	+	-	-	X
A592	2014	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A593	2014	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
A595	2014	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A596*	2014	+	+	+	-	+	+	+	-	-	X
A597*	2014	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
A599	2014	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 12: Resultados por animal en el RAP, para cada uno de los test diagnósticos realizados * animales hijos de madres positivas.

En base a los estudios realizados se pudo observar que las técnicas de diagnóstico directo de paratuberculosis, en animales jóvenes tienen una baja capacidad para identificar animales portadores de la enfermedad.

Sin embargo se pudo observar en el RAP que la primera respuesta detectada fue la humoral alrededor de los 8 meses de edad de los animales, acompañando la evolución de la misma. Se pudo confirmar del diagnóstico de paratuberculosis mediante la presencia de micobacterias en materia fecal por PCR, qPCR y cultivo en medio sólido, este último presente en uno de los animales en seguimiento (Tabla 11).

Si observamos la tabla 12 podemos ver que el 100 % de los animales del RAP presentó respuesta humoral cuando cuantificamos IgG total, con variaciones en el título de anticuerpos, y vemos que al momento de cuantificar los isotipos, el 46% de los animales presentó niveles altos de IgG2, mientras que el 38 % presentó niveles altos de IgG1.

En base a los datos obtenidos con las distintas técnicas diagnósticas en el RAP podemos indicar que solo cuatro de los terneros, hijos de madres positivas, presentaron diagnóstico positivo en algún ensayo (A578 ELISA, aumento de IgG2 e IFN- γ , A579 ELISA y PCR, A597 ELISA, aumento de IgG2, IDR, IFN- γ , PCR, A599 ELISA) son hijos de madres positivas a cultivo (A344, A171, 0543, A222) indicado en la tabla 12.

En el caso del RBP la enfermedad no se evidenció en forma temprana en base a los ensayos realizados, sin embargo, si fueron encontrados indicios de la enfermedad entre los 16 y 18 meses por la presencia de anticuerpos en sangre periférica en un 62% de los animales en estudio. También se detectaron 3 animales presentaron títulos sobre la línea de corte del isotipo IgG2 y dos animales que presentaron niveles altos de IgG1, pero en ninguno de ellos fue posible confirmar la

presencia de Map mediante ninguna de las técnicas confirmatorias utilizadas (Tabla 10) (Figura 23A, 24A).

En base a los resultados de diagnóstico obtenidos realizamos un esquema de la evolución de la respuesta inmune celular y humoral y la eliminación de Map en materia fecal para los dos rodeos en estudio. Se puede observar que el RBP no presentó respuesta celular ni eliminación de Map en las edades evaluadas, sólo fue detectable la respuesta humoral a partir de los 16 meses de edad (Figura 27 A). En el caso del RAP se logró identificar la respuesta humoral de forma más temprana a partir de los 8 meses de edad, fue posible detectar la respuesta celular a los 20 meses y la eliminación de Map a partir de los 10 meses (Figura 27 B). Estos datos difieren del tipo de respuesta que esta publicada previamente donde se destaca como respuesta primaria la respuesta celular (Chiodini y col. 1984).

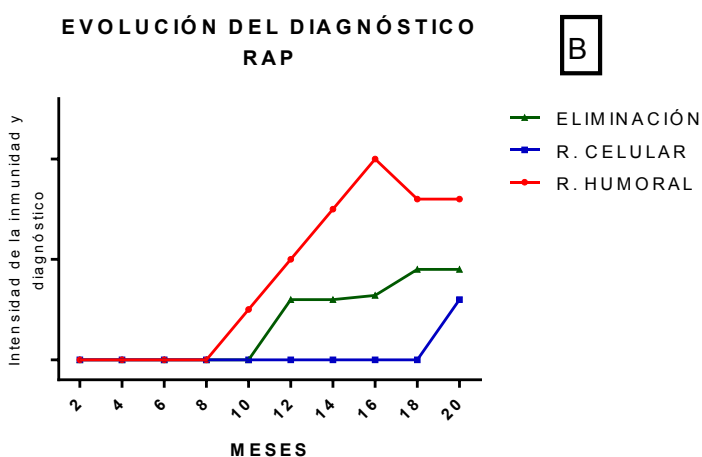
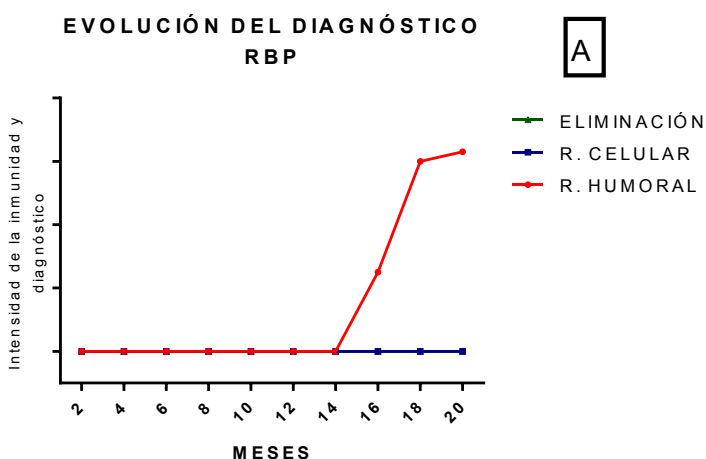


Figura 27: Gráficos donde se observa la evolución de la inmunidad y el diagnóstico en el RBP (A) y en el RAP (B).

En base a los resultados podemos concluir que las pruebas de respuesta humoral presentan una mayor capacidad de detección a edades tempranas en el estudio realizado, a partir de los 8 meses en el RAP, con la limitante que las mismas pueden dar reacciones falso positivas debido a la presencia de micobacterias ambientales (Roussel y col. 2007). Cabe mencionar que para confirmar los resultados de las diferentes técnicas diagnósticas indirectas realizadas en este trabajo se realizaron las técnicas moleculares dado que detectan específicamente a *Map.*

DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE

Con el fin de caracterizar los rodeos y caracterizar cada uno de los animales, en cuanto a su estado sanitario respecto a la paratuberculosis bovina, en esta parte del trabajo, se evaluó la respuesta a las diferentes pruebas diagnósticas en búsqueda de parámetros inmunológicos relacionados con la infección y protección para su utilización como marcadores tempranos.

Los animales en seguimiento en el presente trabajo pertenecen a rodeos con alta y baja prevalencia de paratuberculosis, por lo que presentaban diferentes factores de riesgo para la infección con Map. En estos establecimientos los animales seleccionados para evaluar a partir de su nacimiento fueron hembras, debido a que son las que permanecen en los rodeos lecheros. Por otro lado, presentan distintos estadios hormonales, lo cual condiciona el estado inmunológico de los mismas y a la vez son los animales sometidos al estrés de la preñez y del ordeño, favoreciendo estas condiciones el desarrollo de la enfermedad hasta la aparición de la sintomatología clínica, la cual en bovinos suele aparecer en un periodo prolongado, a partir de los 2 años de edad (Clarke 1997).

Inicialmente se procedió a caracterizar a las vacas de los establecimientos. En el RAP se observó que un 46% de las vacas eran positivas al cultivo de Map. En cambio en el RBP sólo un animal de los 8 muestreados resultó positivo a la PCR IS900, (12,5%) y sólo dos ELISA positivos (25%). Por lo tanto en ambos establecimientos se logró confirmar la presencia del agente causal de la enfermedad. En base a los resultados obtenidos en los terneros con las diferentes pruebas diagnósticas observamos características diferentes según la prevalencia de paratuberculosis en los rodeos. Muchos trabajos han caracterizado un comportamiento particular de la enfermedad, con presencia de respuesta celular al principio de la misma (Mortier y col. 2013; Badi y col. 2010; Stabel y col. 2007) seguida de respuesta humoral. En los estadios subclínicos se produce liberación de Map en las heces, solo en pocos animales. Luego en la etapa clínica se mantiene la

respuesta humoral a lo largo de la enfermedad con la presencia de sintomatología clínica, caracterizada por diarrea crónica y caquexia de los animales (Mortier y col. 2015).

En nuestro trabajo los terneros no presentaron ese comportamiento ya que mostraron niveles incrementados de IgG total Map-específica en suero de sangre periférica. Por lo tanto, este hallazgo en muestras séricas de bovinos podría indicar que los anticuerpos aparecen tempranamente en la infección natural por Map. Los terneros (A579, A589, A597) presentaron altos niveles de anticuerpos a los 8 meses de edad, los animales A579 y A597 son hijos de madres positivas. Nos podemos centrar en el animal A589 el cual además presentó cultivo positivo a los 14 meses, sin presentar liberación de IFN- γ y a los 15 meses diarrea crónica que le produjo la muerte. En cuanto a respuesta humoral trabajos publicados detectaron aumentos significativos de IgG específica frente a Map (bacteria entera) y/o frente a PPA en sueros de bovinos infectados (Abbas & Riemann 1988; Mundo y col. 2008). En estos estudios la IgG1 Map-específica se observó mayormente incrementada en aquellos sueros de bovinos donde también se detectó a Map por cultivo en concordancia con otros estudios publicados donde se utilizaron diferentes antígenos: bacteria entera, PPA, PPDp y LAM (Koets y col. 2001; Mundo y col. 2008). En nuestro trabajo parte de los animales en seguimiento muestran altos niveles de IgG2 específica a Map en sueros, en coincidencia con trabajos previos que han descripto IgG2 específica frente a diversos antígenos de Map en sueros de bovinos con paratuberculosis clínica y subclínica (Koets y col. 2001; Mundo y col. 2008).

Cabe destacar que en este trabajo iniciamos los muestreos a los dos meses del nacimiento hasta los 20 meses, sin conocer el estado de los animales previamente. Estos estudios nos permitieron observar un aumento de los anticuerpos anti-Map en suero mediante ELISA con Ag-WA y Ag-PPA-3. Es necesario mencionar que esta técnica debe ser confirmada con otra metodología complementaria dado que puede presentar reacción cruzada detectando anticuerpos por presencia de otras micobacterias, esta observación fue realizada en ensayos de ELISA para detección de *M. tuberculosis* (Lilenbaum y col. 1999).

En nuestro trabajo pudimos observar respuesta humoral tanto en el RAP como en el RBP.

En el RAP esta presencia de anticuerpos ocurrió alrededor de los 8 meses de edad de los animales, posteriormente detectamos la presencia de micobacterias ácido-alcohol resistentes en extendidos de materia fecal a los 10 meses de los animales, las cuales fueron corroboradas como Map mediante PCR en tiempo final de la secuencia IS900 y pudo ser cuantificada en algunos de los casos mediante qPCR obteniéndose diferente carga bacteriana, entre 1.700 y 200.000 bacterias por gramo de materia fecal, en los animales muestreados. Esta presencia de Map en uno de los animales por PCR se correlacionó con el cultivo solo en un animal. Esto demuestra que el cultivo no sería la mejor técnica para diagnóstico en los periodos tempranos de la infección.

Más aún, en este rodeo se pudo detectar, en algunos de los terneros, Map en materia fecal por PCR que luego se volvió negativo (Tabla 6), este tipo de eliminaciones se denomina pasiva, ya que la bacteria se ingiere por el animal siendo excretada sin causar infección. Esto podría estar ocurriendo en los animales que presentan respuesta humoral positiva, pero la excreción de Map no fue constante (Collins y col. 1996). Dos de los animales que tienen este comportamiento (A579 y A596) son hijos de madres positivas los cuales podrían haber estado expuestos a una importante carga en su nacimiento.

Con respecto a la respuesta celular evaluada mediante el ensayo de liberación de interferón gamma por células de sangre periféricas luego de la estimulación con PPDA en los animales de RAP sólo 3 animales resultaron positivos a esta prueba a los 18 meses de edad, dos de los cuales presentaron engrosamiento del pliegue ano caudal cuando se realizó la aplicación intradérmica de PPDA confirmando la respuesta celular, datos mostrados en la tabla 12.

Además, se hallaron altos niveles de IFN- γ producidos luego de la estimulación PPDB por células periféricas en uno de los animales del RBP a los 2 meses de edad, la cual no fue detectada en los posteriores muestreos (Figura 20). Está descrito que se encontraron altas cantidades de IFN- γ (en células sin estimular)

inespecífico evaluadas mediante la metodología de ELISPOT, principalmente durante los primeros tres meses de vida de terneros (Koets y col. 2006). Olsen en 2005 identificó que las células NK de los bovinos sanos jóvenes son las responsables de la síntesis de IFN- γ inespecífico (Olsen y col. 2005). También se asocia a la producción de IFN- γ por linfocitos T gamma delta, los cuales predominan en los animales jóvenes (Huda y col. 2003).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el RAP donde a partir de los 8 meses los animales mostraron aparición temprana de anticuerpos específicos en suero que luego fue acompañada por resultados positivos por otras técnicas. Estos hallazgos demostrarían que el diagnóstico humoral en rodeos en los cuales la prevalencia de la enfermedad de paratuberculosis es alta podría identificar animales jóvenes recientemente infectados. Por otro lado estos resultados son coincidentes con trabajos de infección experimental que indican que luego de 10 meses de la inoculación ocurre la seroconversión. Este resultado podría trasladarse a la infección natural dependiendo de la carga inicial a la que los animales están expuestos (Lepper y col. 1989). Estos resultados deben ser corroborados mediante una técnica que identifique directamente a Map, no solo por la posibilidad de sensibilización con micobacterias ambientales, sino que podría ocurrir que los niveles de anticuerpos estén asociados a la transferencia de anticuerpos calostrales de las madres que en muchos casos pueden estar infectadas con Map (Osterstock y col. 2007).

En el caso del RBP pudimos observar que cinco animales desarrollaron respuesta humoral, detectando la presencia de anticuerpos en suero mediante ELISA, pero en este caso la presencia de los mismos se observó recién alrededor de los 16 meses de edad, edades mayores comparado con lo observado en el RAP. En estos animales no se observó presencia de micobacterias en materia fecal, ni tampoco se pudo obtener cultivo positivo de los animales muestreados. El 100% de los animales muestreados en este rodeo no presento respuesta celular, cuantificada mediante el ensayo de liberación de IFN- γ . Esta información nos demuestra que la progresión de la enfermedad es más lenta debido a la menor carga de Map a la que los animales están expuestos. Esta observación fue detectada por Mortier donde pudieron confirmar que animales infectados experimentalmente por vía oral con

diferentes dosis de Map presentaron una respuesta celular más temprana cuando se infectaban con dosis altas (Mortier y col. 2014). En cuanto a respuesta humoral se ha reportado que dependiendo de la edad de infección de los animales la respuesta humoral resulta menos eficiente, en el caso de los animales de edades tempranas, ya que la proporción de linfocitos B es baja (Chase y col. 2008) y que cuanto mayor es la carga con la que el animal se infecta mayor es la respuesta humoral (Mortier y col. 2014). En nuestro estudio encontramos que ambos rodeos presentaron respuesta humoral a edades tempranas de los animales y coincidimos con Mortier, que a mayor carga bacteriana mayor respuesta humoral, ya que la respuesta fue mayor en el RAP.

Debido a que ambos rodeos presentaron altos niveles de IgG total y en base a estudios previos que indican que la presencia de isotipos característicos puede estar asociada a la presencia de la enfermedad de paratuberculosis bovina (Koets y col. 2001) nos resultó interesante cuantificar los isotipos IgG1 e IgG2.

Los resultados obtenidos resultaron de gran interés debido a que se observó la presencia del isotipo IgG2, en el RAP a los 8, 16 y 18 meses de edad en valores cercanos al 46% de los animales (Tabla 12), el cual está asociado a la respuesta celular, Th1. Por lo tanto la presencia de IgG2 podría ser un marcador temprano de la enfermedad de gran utilidad para seleccionar los animales que hay que apartar del rodeo. Esto fue informado en trabajos previos, donde destacan que el IgG2/ELISA-PPA permitió identificar a la mayoría de los bovinos infectados (subclínicos y clínicos). Además, un mayor número de bovinos infectados subclínicos es detectado en comparación con el IgGtotal/ELISA-PPA (54 % vs. 23 % para IgG2 vs IgG/ELISA-PPA, respectivamente) (Fernandez 2016). En donde se propone la combinación de IgG2/ELISA-PPA e IgGtotal/ELISA-PPA para incrementar la identificación de rodeos con animales en diferentes estadios de la paratuberculosis.

En cuanto a la sintomatología de los animales muestreados se pudo observar que aproximadamente el 30 % de los animales de RAP presentó diarrea intermitente (A578, A591, A596 y A589) a partir aproximadamente de los 16-18 meses de edad, sin observar signos físicos de la enfermedad, esta descrito que los mismos aparecen a los dos años (Clarke 1997). Uno de ellos A589 presentó diarrea crónica

generando la muerte del mismo, este animal a su vez, presentó cultivo positivo y alto título de anticuerpos sin presentar respuesta celular, cuantificada mediante el ensayo de liberación de IFN- γ . En este animal la intradermorreacción no se llegó a realizar debido a que murió antes de los 20 meses, fecha en la que se aplicó la IDR. Cuando se evaluaron los isotipos en suero el mismo presentó altos niveles de isotipo IgG1 asociado a una respuesta Th2, característica de animales crónicos que presentan una respuesta humoral característica (Koets y col. 2001).

Por otra parte, en el caso del RBP los animales presentaron condiciones físicas normales sin presencia de diarrea.

En este trabajo de tesis también se ha puesto a punto la detección de micobacterias viables mediante la utilización de micobacteriófagos TM4 marcado con una proteína fluorescente roja (Urdániz y col. 2016). El desarrollo de estos estudios permite la obtención de un método de diagnóstico rápido y de fácil detección mediante un microscopio de epifluorescencia o un fluorímetro de placa. Los resultados obtenidos son muy prometedores debido a que es una técnica rápida donde a partir de muestras de materia fecal o leche, se logró detectar a Map en las muestras de materia fecal infectadas *in vitro*, es decir mediante el agregado de micobacterias viables provenientes de cultivo a materia fecal, pero al no haber terneros positivos no pudimos validar la técnica, por lo cual es necesario seguir trabajando en muestras de campo frescas, lo cual es fundamental, ya que la técnica detecta micobacterias viables. En la actualidad existen trabajos donde realizan esta técnica para Map, pero mediante el cultivo de *M. smegmatis* en placas con el agregado de la muestra infectada con el micobacteriófago para observar las unidades formadoras de placas generadas por las micobacterias infectadas por el fago tanto en muestras de materia fecal (Foddai y col. 2011; Basra y col. 2014), leche pasteurizada (Botsaris y col. 2016), y sangre (Swift y col. 2013). También existen test comerciales para detección de *M. tuberculosis* que fueron evaluados para Map obteniendo correlaciones del 100% con el cultivo líquido (Foddai y col. 2009).

En base a los resultados obtenidos en el capítulo de diagnóstico de la presente tesis queda evidenciado que en los dos rodeos en los cuales se trabajó, los animales

presentaron una respuesta serológica característica que fue en aumento a lo largo del estudio, independientemente de la cantidad o carga de Map que presentaban los animales y sin desarrollo de respuesta celular temprana en las edades del trabajo.

También pudimos observar que varios de los animales de RAP presentaron títulos altos del isotipo IgG2, que en algunos casos pudo ser correlacionado con respuesta celular cuantificable. La determinación de este isotipo podría ser un buen indicador de enfermedad como fue descrito en trabajos previos (Fernandez 2016), Podría aumentarse su sensibilidad realizando la detección de los anticuerpos mediante citometría de flujo (Eda y col. 2005). Las técnicas serológicas siempre deben asociarse a una técnica en la cual se pueda identificar el agente causal de la enfermedad, como una PCR IS900 en materia fecal y/o mediante el uso de micobacteriófagos que nos indicarían la viabilidad de Map.

SEGUNDA PARTE

RESPUESTA INMUNE

En el presente estudio de tesis se caracterizó el sistema inmune de bovinos pertenecientes a rodeos infectados con paratuberculosis determinando la frecuencia de los diferentes *subpoblaciones celulares* que componen la serie blanca y la *expresión de citoquinas* en CMSP. Esta caracterización fue realizada en terneros desde su nacimiento hasta los 18 meses de edad. Para ello se analizaron tres rodeos experimentales RAP, RBP y RN para así poder definir en mayor profundidad la funcionalidad del sistema inmune en los bovinos nacidos en rodeos que presentan paratuberculosis.

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T EN LOS DIFERENTES RODEOS

Se evaluó la frecuencia de las diferentes subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Para ello se marcaron las células mononucleares de sangre periférica de los animales pertenecientes a los tres rodeos, RAP, RBP y rodeo negativo con anticuerpos anti-CD4 anti-CD8 y anti-WC1 marcados con distintos fluorocromos. Se evaluó además el porcentaje de activación de los mismos a través de la expresión de CD25.

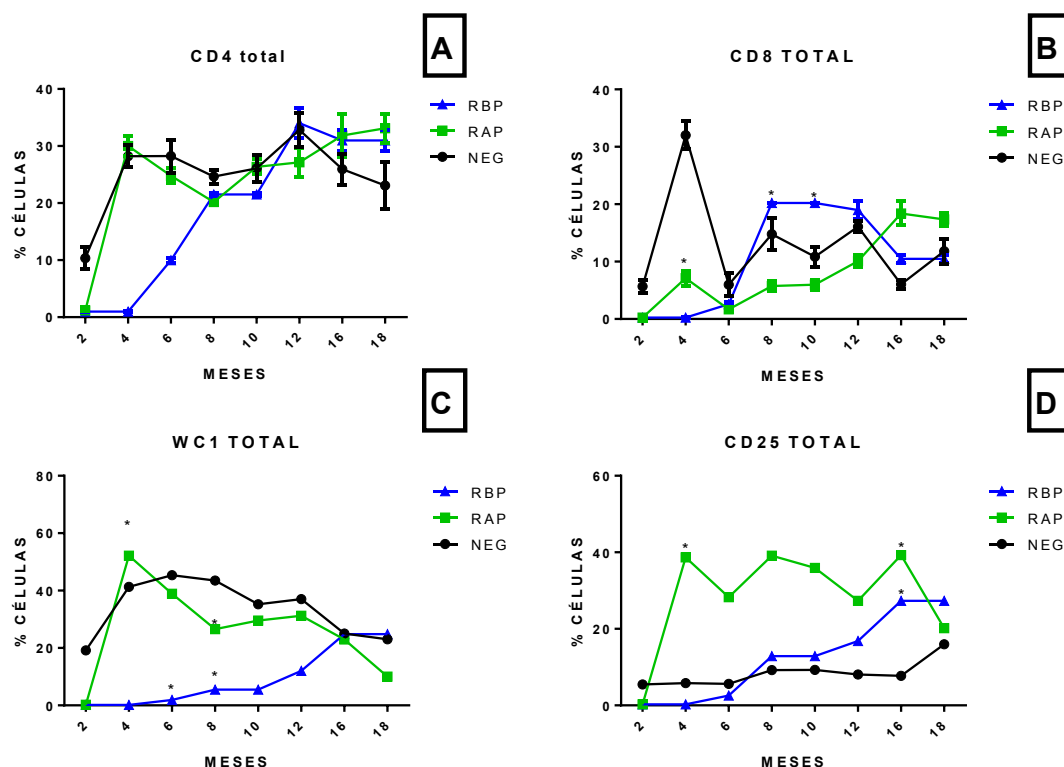


Figura 28: Comparación de la frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B), $WC1^+$ (C) y del porcentaje de activación ($CD25^+$) (D). Las determinaciones se realizaron sobre células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica de animales pertenecientes a los 3 rodeos muestreados y se expresaron en función de la edad del animal. * Diferencias significativas, Test Kruskal-Wallis $p < 0.005$.

Al evaluar los diferentes rodeos se observó que la frecuencia de la subpoblación $CD4^+$ en los primeros seis meses de edad era menor en el rodeo RBP respecto al RAP y al rodeo negativo (Figura 28 A). El análisis de la subpoblación de $CD8^+$ demostró una mayor frecuencia de estas células en el RBP, respecto al RAP con una diferencia estadísticamente significativa a los 8 y 10 meses de edad (Figura 28 B). En el caso de los $WT \gamma\delta$ ($WC1^+$), que son un nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, presentaron la mayor frecuencia en el RAP respecto al RBP entre los 4 y 12 meses de edad siendo estadísticamente significativa. Pero los valores en el RAP fueron semejantes a los de los controles, esto no lleva a considerar significativa la disminución que se observa en la población $WT \gamma\delta$ ($WC1^+$).

en RBP (Figura 28 C). Destacado fue que cuanto determinamos la expresión del CD25⁺ en las diferentes subpoblaciones linfocitarias observamos que el RAP presentó un mayor grado de activación respecto al RBP y al rodeo negativo, con diferencias estadísticamente significativas a los 4 y 16 meses de edad. En el RBP podemos observar un aumento en el porcentaje de activación recién a los 16 y 18 meses respecto al rodeo negativo (Figura 28 D).

Concluimos de los resultados de esta figura que las poblaciones CD4⁺ y WC1⁺ en los primeros meses se comporta diferente en el RBP con respecto al RAP. En el RBP hay una disminución a tiempos tempranos de estas dos poblaciones y un aumento de CD8⁺ en alguno de los meses estudiados (recordemos que en el RBP ningún animal fue positivo con test que mide IFN- γ ni a la IDR). Pero, el porcentaje de células activadas (CD25⁺) aumentó en función de la edad de los animales en ambos rodeos, RAP y RBP, respecto al negativo. Estos resultados podrían mostrar que existe una respuesta de activación específica frente a la infección y que además esta respuesta podría estar exacerbada en los animales pertenecientes a establecimientos que presentan una prevalencia elevada de la enfermedad, como en el caso del RAP, en todos los tiempos evaluados (a partir de los 4 meses). Mientras que en el RBP el aumento en la poblaciones activadas se presenta a mayores edades de los animales (a partir de los 12 meses) (Figura 28 D).

En la Figura 29 nos centramos en el RAP y vemos los porcentajes de las distintas subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺; WC1⁺ y la expresión de CD25⁺ antes y después de la estimulación de las CMSP con PPDA en función del tiempo. En el caso de la frecuencia en subpoblación CD4⁺ presenta un comportamiento uniforme en el tiempo (Figura 29 A) y para la subpoblación CD8⁺ podemos observar una mayor frecuencia a los 16 y 18 meses respecto a los 12 meses (Figura 29 B). En el caso de la subpoblación WC1⁺ se observa que la frecuencia de esta población disminuye respecto a la edad, sin variaciones luego del estímulo (Figura 29 C). En ninguna de estas poblaciones se observó variación luego del estímulo (Figura 29 A, B y C)

En la cuanto a la expresión de CD25 (que pueden pertenecer a diferentes subpoblaciones linfocitarias) comparada en los últimos tres tiempos (Figura 29 D),

podemos observar que a los 12 y 16 meses presentan un porcentaje de activación similar, sin embargo solo se observó un incremento al estimular con PPDA estadísticamente significativo respecto al mismo tiempo sin estimular, a los 16 meses de edad. Esto nos estaría mostrando que podría existir una respuesta específica frente a la infección a los 16 meses en el RAP. Sin embargo este aumento en la población y en la respuesta frente al antígeno no se observa a los 18 meses.

En el caso del RBP y rodeo negativo no se muestran los resultados porque no hubo cambios en las diferentes subpoblaciones frente a la estimulación con el antígeno específico.

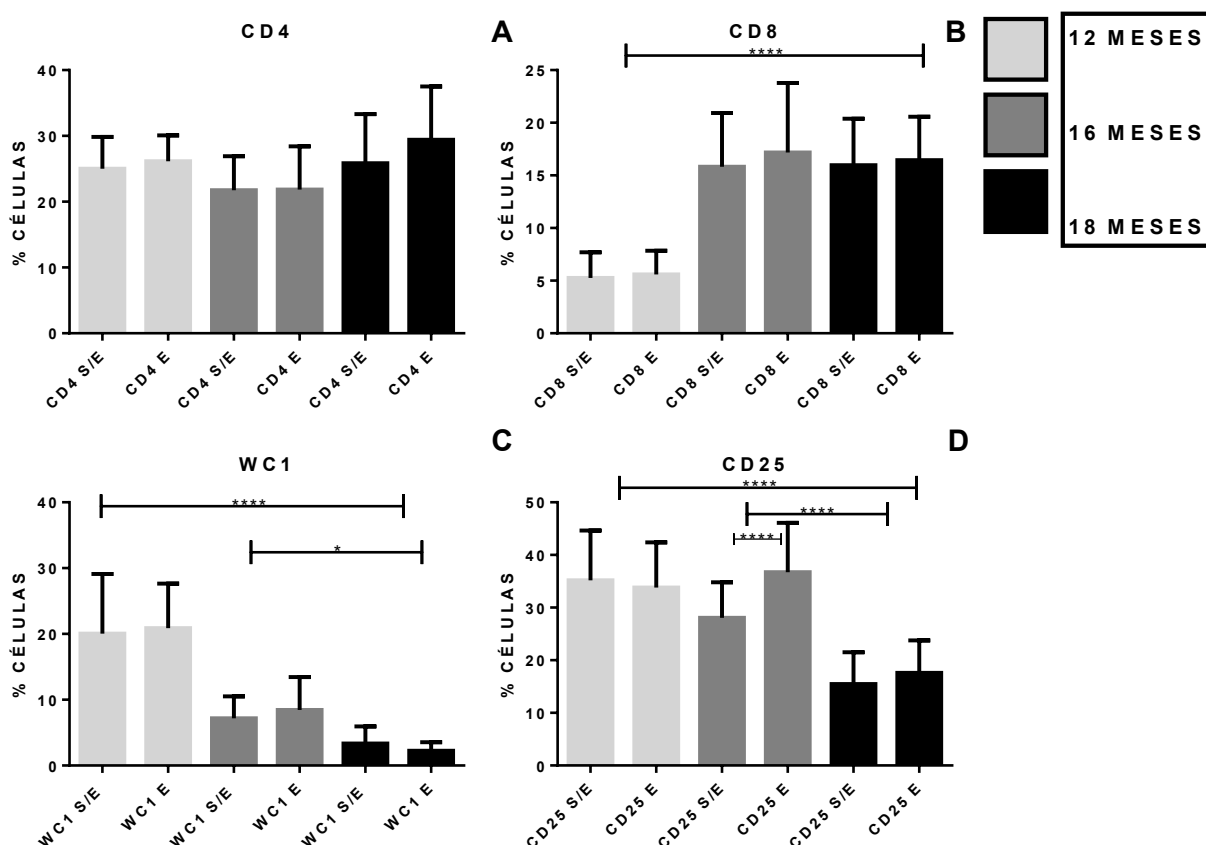


Figura 29: Evolución de los diferentes fenotipos de poblaciones linfocitarias de CMSP comparada en el tiempo en el RAP, sin estímulo (S/E) y con estímulo (E) con PPDA. * Diferencias significativas, Test Kruskal-Wallis *p<0.1****p<0.0001

POBLACIONES LINFOCITARIAS T ACTIVAS (CD25+) EN LOS DIFERENTES RODEOS

Para evaluar las diferentes subpoblaciones linfocitarias activadas, se evaluaron los marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-WC1 comarcadas con anti-CD25, determinándose la capacidad cada una de las subpoblaciones de linfocitos, provenientes de sangre periférica, de responder en forma específica a la estimulación con PPDA en función de la edad de los animales de los rodeos en estudio. En la figura 30 se muestran los resultados.

Al observar la frecuencia de células $CD4^+CD25^+$, vemos un aumento significativo de esta población en el RAP a los 10 meses de edad con respecto al RBP. Al mismo tiempo se pudo observar que desde los 4 a los 16 meses los niveles de $CD4^+CD25^+$ presentaron mayores niveles en el RAP; sin embargo este incremento fue solo estadísticamente significativo a los 10 meses (Figura 30 A). Hay que considerar que en cada grupo los animales pueden estar expuestos a la infección de diferente forma, por lo que es destacable observar que entre los 4 y los 16 meses un mayor número de animales del RAP presentaron valores elevados en la frecuencia de esta subpoblación activada ($CD4^+CD25^+$).

Cuando observamos los porcentajes de activación de la población $CD8^+CD25^+$ los mismos presentaron menor frecuencia con diferencias estadísticamente significativas en el RBP y el RAP a los 2, 4 y 12 meses de edad respecto al rodeo negativo. Sin embargo el RAP mostró un aumento en el porcentaje de activación de esta población a los 8 meses de edad estadísticamente significativo con respecto al RBP y el rodeo negativo (Figura 30 C).

Al evaluar la subpoblación de LT gamma delta ($WC1^+$) se pudo observar mayores porcentajes en el rodeo negativo respecto al RBP y el RAP entre los seis y doce meses, estas diferencias fueron estadísticamente significativas a los 6 meses de edad (Figura 30 B). Acá también encontramos un tiempo (a los cuatro meses de edad) donde el RAP presento mayor porcentaje de esta subpoblación con diferencias estadísticamente significativa respecto al RBP:

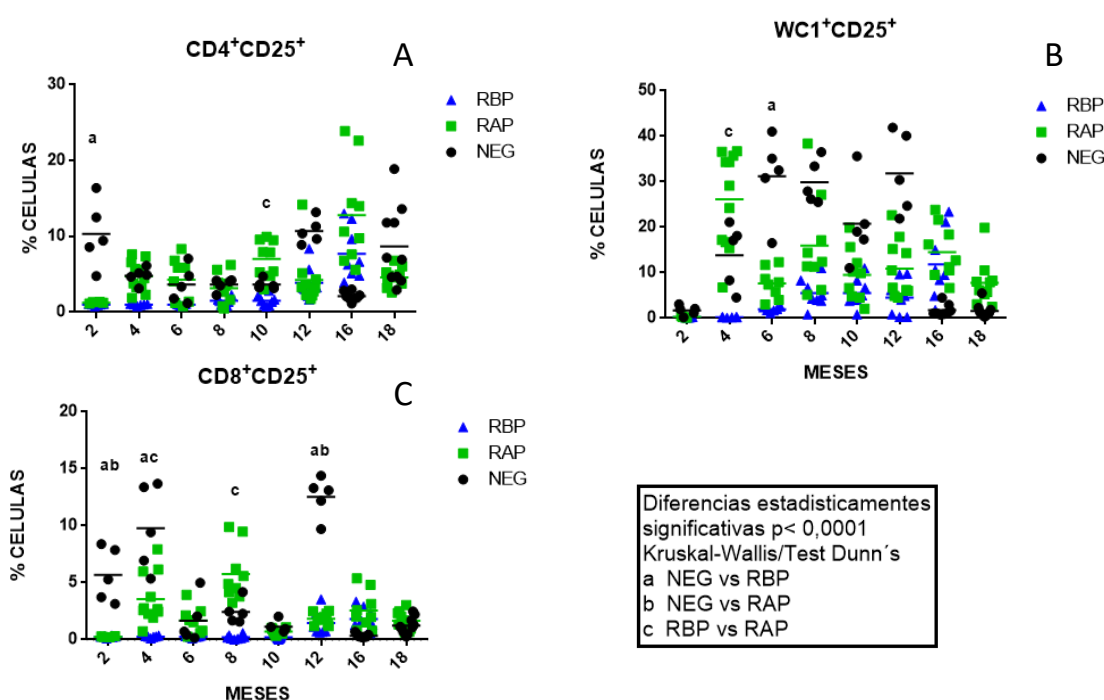


Figura 30: Porcentajes de activación (CD25⁺) en linfocitos T CD4⁺ (A), WC1⁺ (B) y CD8⁺ (C) estimulados con PPDA en los rodeos de estudio en función de las edades de los animales.

Una conclusión de lo observado en la Figura 30 es que un número importante de animales del RAP tienen aumento en el porcentaje de activación de la subpoblación CD4⁺CD25⁺ a diferentes edades, mientras que en este rodeo los animales solo en tiempos tempranos, 4 meses, presentaron aumento de la población WC1⁺CD25⁺. Cuando evaluamos cuales son los animales positivos con el test que mide liberación de IFN- γ , recordemos que a partir de los 16 meses, solo 3 animales del grupo de animales del RAP dieron esta reacción positivos (A579, A596 y A597), y de ellos solo el animal A596 presentó mayor población CD4⁺CD25⁺, con respecto a la media, a los 18 meses (Figura 30 A). Mientras que los animales A579 y A597 presentaron un aumento de WC1⁺CD25⁺ con respecto a la media de los animales del rodeo (Figura 30 B). Los animales del RBP se encuentran por debajo de los valores alcanzados por los otros dos rodeos en todas las poblaciones activadas.

En la Figura 31 se muestran los valores de las diferentes subpoblaciones de LT activadas en el RAP, con y sin estímulo con PPDA, en función del tiempo. Los

resultados obtenidos revelarían una incidencia de la respuesta T basada en la subpoblación $CD4^+CD25^+$, a los 12, 16 y 18 meses (media $>5\%$), acompañado de aumento en la población $WC1^+CD25^+$ (también con frecuencia media $>5\%$). Este aumento en estas dos subpoblaciones y a los tiempos nombrados, se observa en la mayoría de los casos con aumento en la estimulación con el antígeno. A los diez meses de edad hay una disminución de las mismas con un aumento de la población $CD8^+CD25^+$ mostrando una respuesta citotóxica. A las edades tempranas 2 y 8 meses todas las subpoblaciones presentan muy bajas con frecuencias $< 5\%$.

R. ALTA PREVALENCIA

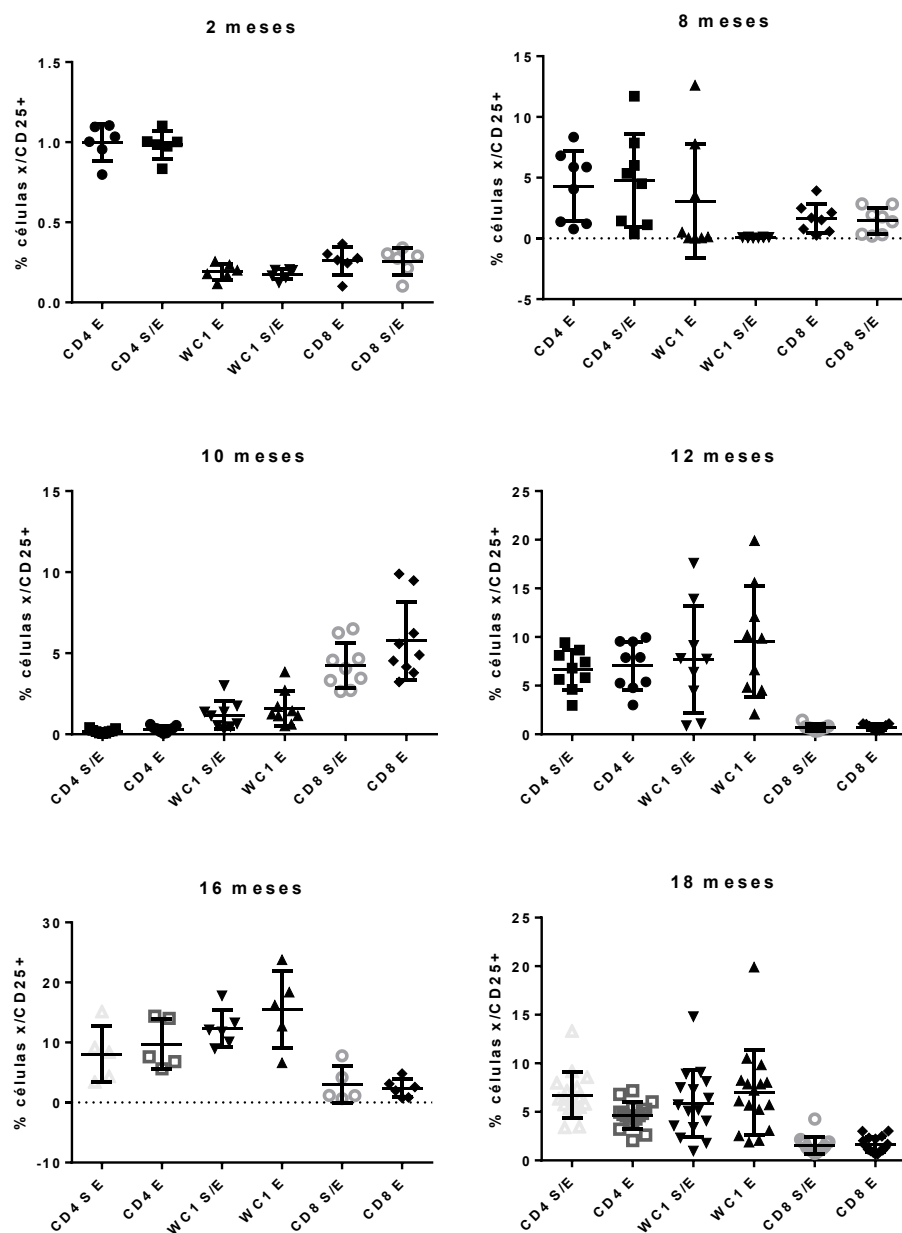


Figura 31: Subpoblaciones linfocitarias activas presentes en cada uno de los muestreos realizados en el RAP, con y sin estímulo con PPDA, individualizado para cada edad muestreada los animales.

En el RBP se observó un comportamiento similar al RAP, con una marcada incidencia de la respuesta celular T, asociada a las subpoblaciones $CD4^+CD25^+$, a los 12 y 18 meses (media > 5 %). En el RBP al igual que en el RAP el aumento en $WC1^+CD25^+$ acompaña al de $CD4^+CD25^+$ en los últimos meses (media > 5%). Destacándose una mayor frecuencia de las subpoblaciones $CD4^+CD25^+$ a los 12 meses de edad (media > 20%) (Figura 32).

R. BAJA PREVALENCIA

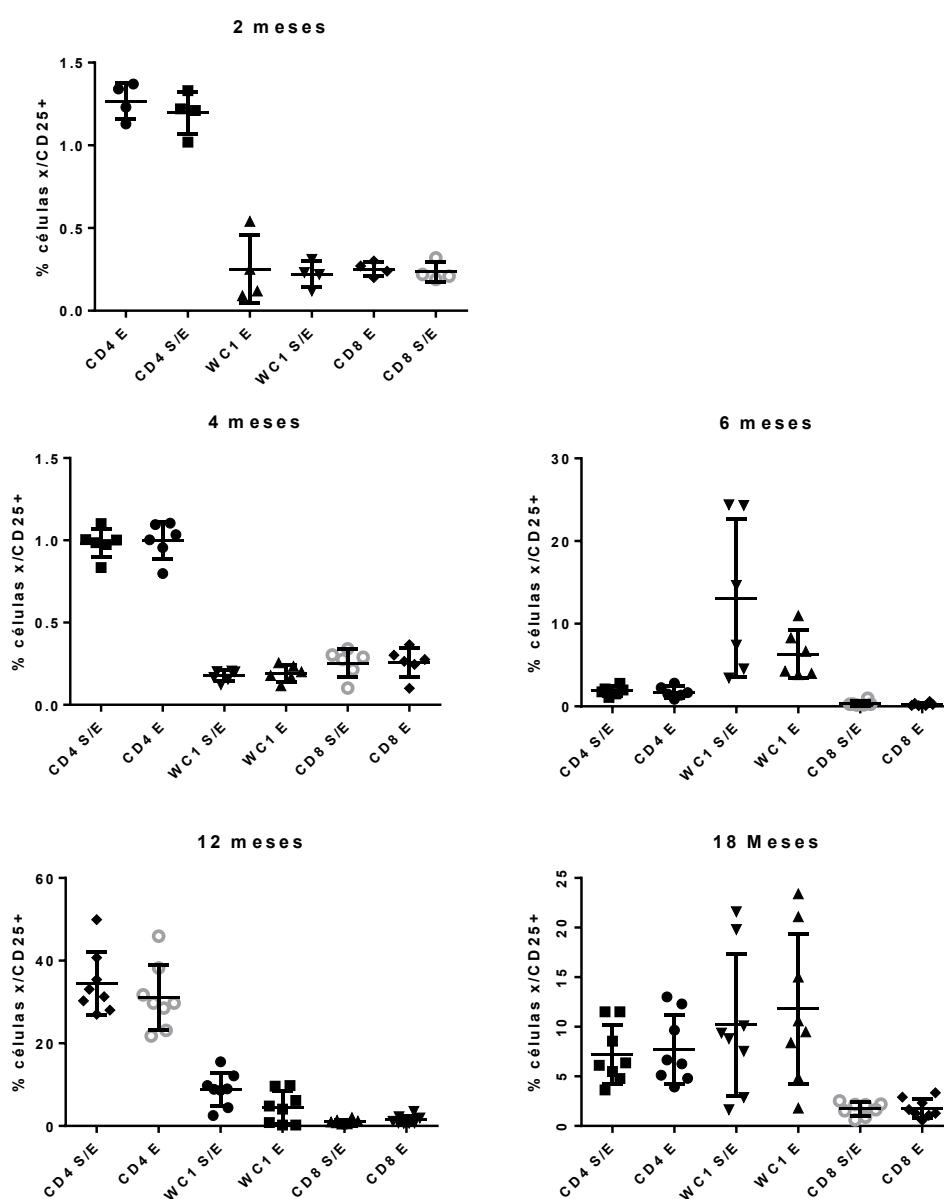


Figura 32: Subpoblaciones linfocitarias activas presentes en cada uno de los muestreos realizados en el RBP, con y sin estímulo con PPDA, individualizado para cada edad de los animales.

Debido a la heterogeneidad de los resultados en los animales agrupados por rodeos, posiblemente debido a que los mismos constituyen un grupo no homogéneo en cuanto a su estado frente a la infección, se determinó en base al objetivo planteado en la presente tesis agrupar los animales según los resultados obtenidos de respuesta humoral. Se agruparon los animales en función de los resultados obtenidos de serología (ya que ningún animal presentó cultivo positivo), agrupando animales que presentaron alto título (SEROLOGIA +) y a los animales que presentaron título bajos o negativos (SEROLOGIA -), a los 16 meses de edad. En base a ello se analizaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias para evaluar si existe algún marcador de enfermedad y/o protección.

En base a los resultados observamos que los animales del grupo RBP que no seroconvirtieron tuvieron mayores valores de CD4+CD25+ y CD8+CD25+ (Figura 33 A y B). Indicando que ambas poblaciones pueden estar involucradas en protección. En cuanto a los cambios en los animales serología+, estos presentaron mayor frecuencia de LT gamma delta ($\gamma\delta$) activados ($WC1^+CD25^+$) en los dos rodeos con presencia de la enfermedad, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas frente al rodeo negativo, observándose que en el caso del RBP las frecuencias obtenidas presentaron mayor magnitud (Figura 33 C). Esto indicaría una fuerte presencia de esta última población para contener la infección en ambos rodeos.

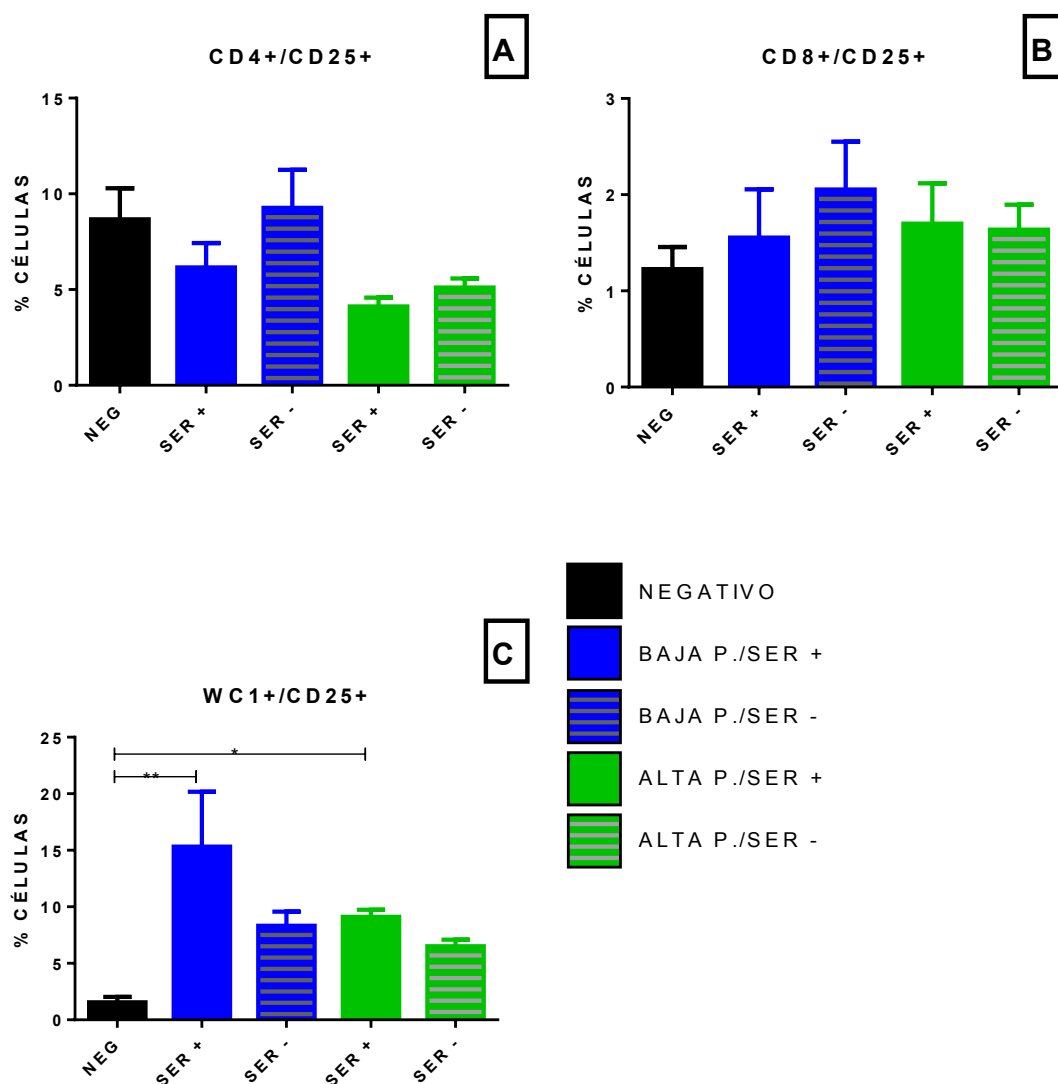


Figura 33: Subpoblaciones linfocitarias de los diferentes grupos basados en el título de anticuerpos presentes en los rodeos en estudio, a los 16 meses de edad. Diferencias significativas, Test Kruskal-Wallis * $p < 0.1$ ** $p < 0.05$.

POBLACIONES LINFOCITARIAS B EN LOS DIFERENTES RODEOS

Al evaluar los LB (CD21⁺) a los 18 meses de edad, responsables de la respuesta humoral se pudo observar que el rodeo negativo presentó una mayor frecuencia con respecto a los dos rodeos infectados, en el caso del RAP se observa

una menor frecuencia de esta población, presentando mayores diferencias significativas (Figura 34) (las determinaciones no se realizaron en el resto de los muestreos debido a no tener disponible el anticuerpo).

Esto parecería una contradicción que discutiremos luego, ya que los animales de los rodeos infectados muchos de ellos tuvieron títulos altos de anticuerpos. En el RBP la proporción de animales serología positiva fue 62.5% y en el RAP fue 100%. En la esta Figura 34 consideramos la frecuencia de linfocitos B de todos los animales de cada uno de los rodeos, sin hacer distinción de cuales fueron serología positiva o negativa, ya que no hubo diferencias entre estos dos grupos de animales.

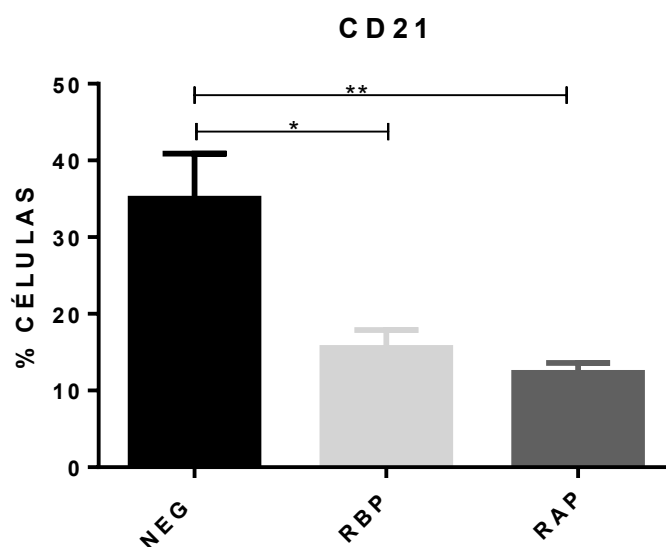


Figura 34: Frecuencia de linfocitos B en sangre periférica (CD21⁺) presentes en los rodeos en estudio a los 18 meses de edad. Diferencias significativas, Test Kruskal-Wallis * $p < 0.1$ ** $p < 0.05$

EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Para continuar con la caracterización de la respuesta inmune se decidió evaluar las diferentes citoquinas presentes en CMSP estimuladas con PPDA. Las citoquinas estudiadas en el ensayo fueron IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17, CXCL9, CXCL10, TNF α e IFN- γ . Como observación general, las CMSP de los animales pertenecientes a rodeos infectados, en el RBP y el RAP, respondieron frente al estímulo con PPDA expresando mayor IFN- γ que las células de los animales del rodeo negativo (Figura 35). Este fue un resultado esperado ya que algunos de los animales del RAP resultaron positivos al test que mide liberación de IFN- γ (ver descripción del diagnóstico de los animales de los rodeos infectados, tabla 12). En cuanto a la comparación de los resultados entre los rodeos infectados observamos diferencias significativas, presentando mayor expresión de IFN- γ el RAP. También esto coincide con lo observado en la descripción del diagnóstico de los animales de ambos rodeos, ya que ningún animal del RBP dio el test de liberación de IFN- γ positivo. Posiblemente la detección de la expresión de IFN- γ sea más sensible que la detección de la citoquina mediante ELISA por esta razón en el RBP se detectó la expresión de la misma, sin obtener resultados positivos en la detección mediante el ensayo de liberación cuantificado por ELISA.

Al evaluar la expresión de TNF α , también se observa aumento de esta citoquina en el RBP y RAP, y a la vez mayor expresión en el RAP, con diferencias significativas entre ambos rodeos a los 16 y 18 meses de edad. La otra citoquina que aumenta en ambos rodeos es la IL2, y también el aumento RAP fue mayor y las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los grupos de rodeos infectados a los 16 meses de edad; sin embargo cuando se realizó la evaluación a los 18 meses, se sigue observando el aumento de esta citoquina sin diferencias entre el RAP y RBP (Figura 35 A y B). La IL-8 no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

Para evaluar la respuesta inmune del tipo Th2 desarrollada en los bovinos infectados se estudió la expresión de IL-4 e IL-10. AL evaluar la expresión de las

mismas en CMSP luego de la estimulación con PPDA en los animales del RBP y del RAP se observó un aumento de expresión de IL-10 con respecto a los bovinos del grupo control. Las diferencias entre los rodeos infectados no fueron estadísticamente significativas.

Si comparamos el aumento en la cantidad de IL-10 en los animales pertenecientes a los rodeos infectados y el aumento de las citoquinas proinflamatorias, vemos un predominio de una respuesta de tipo Th1 (mayor aumento de IFN- γ e IL-2), Estos aumentos si bien ocurren en ambos rodeos infectados el predominio se ve en los animales pertenecientes al RAP. Con respecto a los niveles de expresión de IL-4, en los animales del RBP fue una pequeña disminución y en el RAP un aumento, pero ninguno presentó diferencias significativas con el grupo control. En cuanto a la respuesta inmune Th17 desarrollada en los bovinos se pudo observar una mayor expresión de IL-17 en los rodeos infectados, presentando un aumento significativo en el RAP a los 18 meses con respecto al RBP (Figura 35 B).

También se evaluó la expresión de quemoquina CXCL9 un mensajero de células efectoras Th1 asociado a IFN- γ . En cuanto a la expresión de esta quemoquina se observó aumento respecto al grupo control, pero manteniendo una expresión que no fue estadísticamente significativa con respecto al control en los tiempos evaluados (Figura 35).

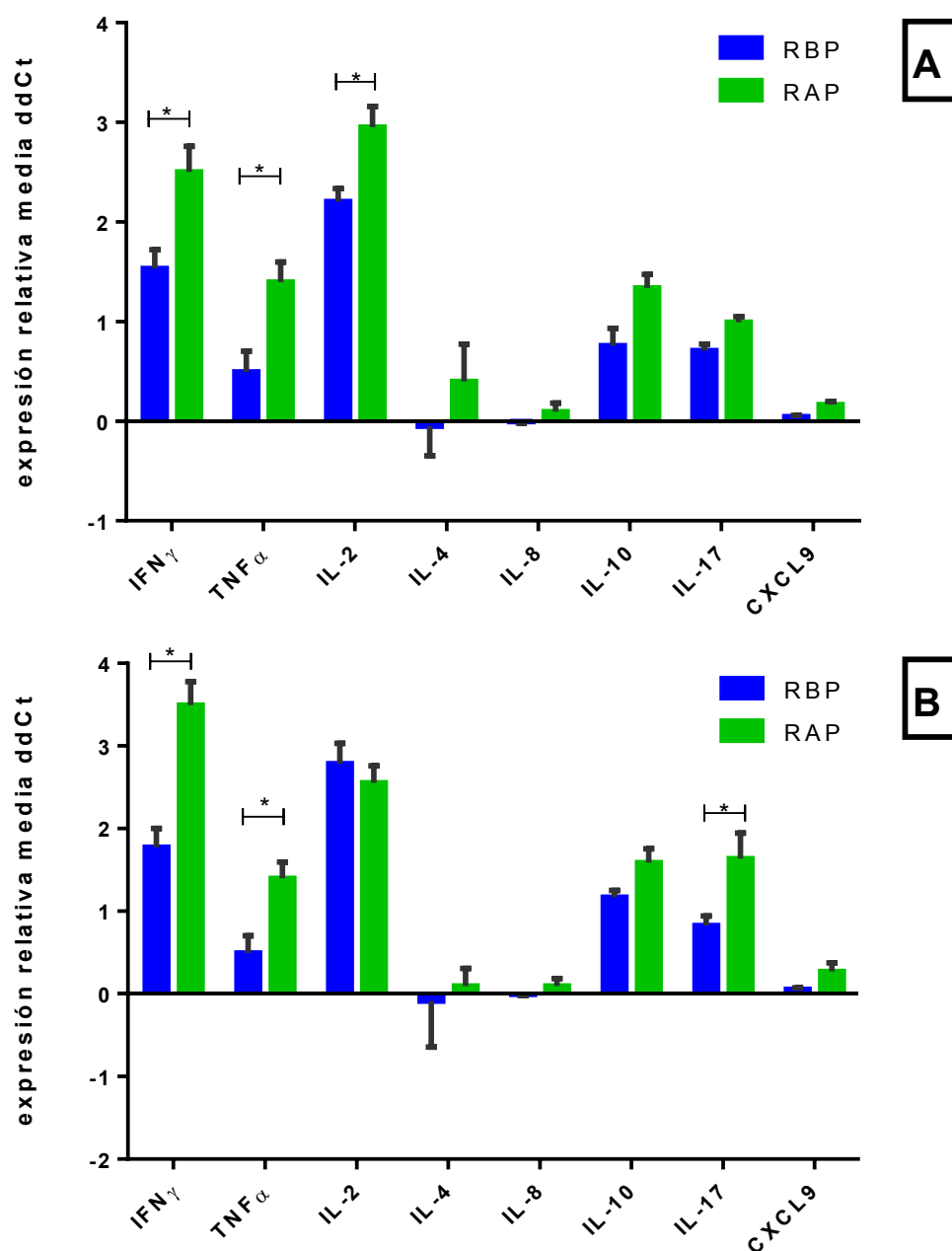


Figura 35: Expresión relativa de citoquinas en animales naturalmente infectados en el RBP y el RAP con respecto al grupo control, los datos fueron analizados con el GraphPad mediante el test de comparaciones múltiples de Sidak's (* estadísticamente significativo $p < 0,05$). (A) 16 meses de edad (B) 18 meses de edad.

Para detectar algún marcador de enfermedad siguiendo el objetivo de la presente tesis se realizaron análisis individuales de los animales. Cuando agrupamos los animales en base a su serología como en el caso de las subpoblaciones linfocitarias nos encontramos que los resultados obtenidos individualmente presentaban mucha variación, por lo cual no era posible determinar diferencias en los mismos. Por esta razón decidimos trabajar con el grupo de animales que presentaron además de serología positiva, otro resultado positivo en los diagnósticos, donde solo los animales del RAP tenían esta característica y se compararon con animales serología negativa del RBP. Se seleccionaron 5 animales de acuerdo a la tabla 12 de los cuales 2 (A596, A597) presentaron diagnóstico positivo a ELISA, IFN- γ , IDR, PCR (a los 16 y 20 meses respectivamente), aumento en IgG2, el animal A596 además presentó diarrea intermitente, el A587 ELISA e PCR positivo (a los 20 meses) y aumento de IgG2, el animal A578 ELISA, IFN- γ positivo, ZN, aumento de IgG2 y diarrea intermitente y el animal A579 ELISA, ZN y PCR positivo (a los 14 meses). Para evaluar si presentaban diferencias en cuanto a la expresión de citoquinas se compararon frente a dos animales con serología negativa del RBP (074, 556). No se pudo incorporar animales cultivo positivo, porque de todos los terneros analizados solo obtuvimos un aislamiento de un animal (A589) que murió durante el tiempo de los muestreos. El aislamiento de este animal y de las madres, nos permitieron confirmar la presencia de la enfermedad e identificar el tipo genético de las cepas que circulan. En el apartado de diagnóstico vemos que solo 4 terneros (A578, A579, A597, A596) correspondían a madres positivas. Del análisis de los terneros positivos pudimos observar que el comportamiento fue variable en la mayoría de los animales, pero destacamos que todos los animales con diagnóstico positivo de paratuberculosis tuvieron mayores valores en todas las citoquinas que los animales que fueron negativos al diagnóstico. Destacándose en el animal A587 una expresión mayor de TNF- α entre los 6 y 16 meses de edad acompañada de una mayor expresión de IFN- γ a los 18 meses. También pudimos observar en el animal A597 una expresión aumentada de IL-2 entre los 6 y 18 meses de edad, con un pico de aumento de IL-17 a los 14 meses. El animal A596 presentó altos niveles de IL-17 a partir de los 14 meses de edad (Figura 36). En cuanto al resto de los animales mostraron comportamientos similares presentando en algunos casos aumento de

IFN- γ , como en el animal A578 (Figura 36 A). Si analizamos el cambio en las citoquinas en función de la edad, se observó una tendencia en aumento en la expresión de TNF- α con la edad (Figura 36 B). La IL-10 no mostro diferencias entre los animales con diagnóstico positivo a lo largo del tiempo, tampoco mostro variaciones con la edad en los animales con diagnóstico negativo, pero estos últimos mostraron valores menores que los animales infectados, aunque los valores no fueron estadísticamente significativos (Figura 36 D). La IL-2 a no ser en el animal A597, presento en el resto de animales un comportamiento estable a lo largo del tiempo (Figura 36 C) y el caso de la IL-17 presento un tendencia en aumento a mayor edad (Figura 36 E).

De este análisis concluimos que todas las citoquinas producidas por las células Th1, así como la IL-17 producida por las células T-helper 17 (Th17), mostraron en alguno de los animales infectados valores significativos altos. La IL-10 presentó valores aumentados en los animales infectados con respecto a los animales con diagnostico negativo. Aunque los valores no son significativos son coincidentes con los datos de IL-10 en la figura 35. Existió una gran heterogeneidad en la respuesta protectora que se manifestó en cada uno de los animales infectados.

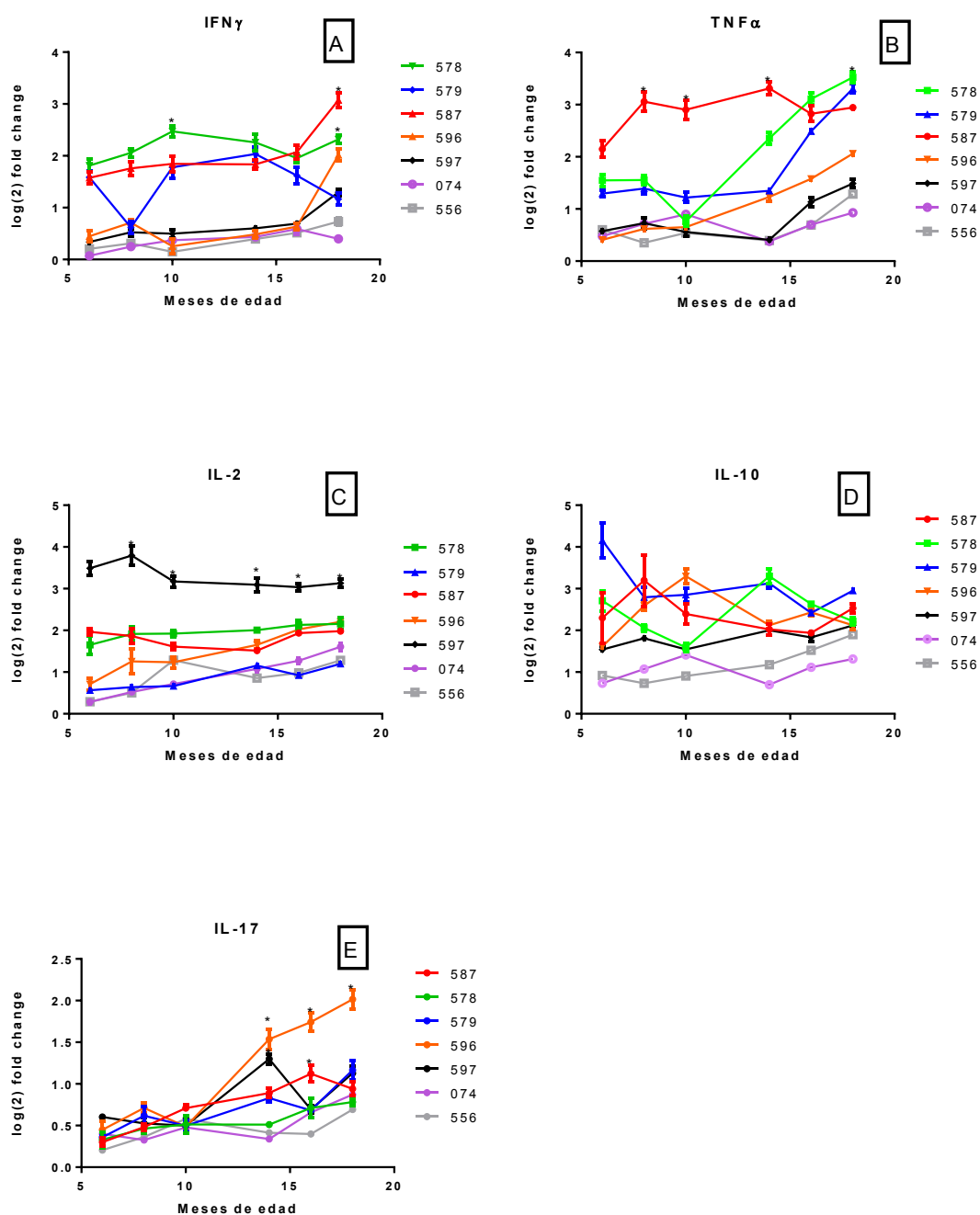


Figura 36: Expresión relativa de citoquinas en animales naturalmente infectados en el RAP en función de la edad, los datos fueron analizados con el GraphPad mediante Two-way ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Turkey (* estadísticamente significativo $p < 0,05$). (A) IFN- γ (B) TNF- α (C) IL-2 (D) IL-10 (E) IL-17.

DISCUSIÓN

SEGUNDA PARTE

En base a los resultados obtenidos de las diferentes subpoblaciones de LT y LB de los rodeos en estudio pudimos observar diferentes comportamientos.

Inicialmente las mayores diferencias las vimos en el marcador de superficie CD25⁺ (Figura 28 D) (que pueden pertenecer a diferentes subpoblaciones linfocitarias), que es el receptor de la IL-2, un indicador de activación temprana de linfocitos T. Este marcador que media la respuesta inmune adaptativa de activación, presentó un patrón proliferativo, que se destaca en el RAP. También, observamos a los 16 meses una estimulación antígeno específica de las subpoblaciones activadas (Figura 29 D). Además se observó que el valor medio de los de los linfocitos CD25⁺ en el grupo de animales del RAP fue > 20 % de los 4 a los 16 meses de edad de los terneros (Figura 28 D). Este valor fue alrededor del doble del observado en el grupo de animales del RBP. Los animales del RBP aumentan lentamente la proporción de linfocitos activados, logrando a los 18 meses una respuesta semejante a la del RAP. Estos resultados obtenidos a partir de este marcador serían de gran importancia, ya que indicaría que el receptor de la IL-2 se expresó tempranamente en el RAP, y dicha expresión ocurriría por un contacto de las células presentadoras de antígenos con la bacteria a edades tempranas sin embargo a los 18 meses no se observó la estimulación con PPDA, posiblemente se deba a que en el modelo bovino, *in vivo*, el receptor se encuentra de manera constitutiva en la membrana de diferentes subpoblaciones linfocitarias, indicando que existen subpoblaciones de la especie bovina que poseen un estado de activación *in vivo* independiente de la estimulación antigénica (Bembridge y col. 1995; Liébana y col. 1999; Pollock y col. 2001).

En cuanto a la expresión de IL-2 se pudo observar que ambos rodeos infectados presentaron altos niveles (Figura 35), pero mientras que los niveles de esta citoquina eran altos pero semejantes en ambos rodeos infectados, a los 18 meses, se observó un aumento significativo en el RAP con respecto al RBP a los 16 meses de edad en concordancia con los resultados obtenidos con el marcador de

superficie CD25⁺ receptor de la misma. Esta concordancia se debería a que la IL-2 posee efecto autócrino por lo tanto la expresión de CD25⁺ en la membrana linfocitaria debe aumentar si la síntesis de IL-2 aumenta (Tizard 2013). Resultados similares se han encontrado en pequeños rumiantes pero en infecciones experimentales, por lo que las diferencias se observan a menores edades (Burrells y col. 1999).

La subpoblación de linfocitos T gamma/delta (WC1⁺) es característica de las especies bovinas, ya que se pueden presentar en animales jóvenes hasta en un 40% (Tizard 2013). Esta subpoblación como respuesta de activación pueden generar TNF- α , IL-1, IL-12 e IFN- γ , lo cual sugiere que pueden promover la inflamación y contribuir al predominio de la respuesta Th1, actuando como nexo de la respuesta innata y adquirida. Sin embargo, también se ha descrito que los LT gamma/delta (WC1.1⁺ y WC1.2⁺) actúan de manera regulatoria mediante la secreción de IL10 (Hoek y col. 2009). Si bien esta población WC1⁺ en los animales del RAP y del rodeo sano la observamos con mayor frecuencia en el primer año de vida, los resultados en el RBP fueron contradictorios, con valores bajos en los primeros años de vida y que aumentan luego del año de edad (Figura 28 C). Se ha descrito que la disminución de LT WC1⁺ totales en sangre periférica podría estar asociado a una respuesta local, debido a que esta subpoblación de linfocitos se podrían encontrar en las lesiones y no circulando en sangre como se ha descrito en otros trabajos (Pollock y col. 1996).

Cuando observamos los porcentajes de activación de las diferentes subpoblaciones (Figura 30), con el objeto de evaluar a que subpoblación corresponde el aumento en los linfocitos CD25⁺ que caracteriza a los animales del RAP, observamos que mayor cantidad de animales del RAP presentan aumento en el porcentaje de CD4⁺CD25⁺. Si bien el aumento de esta población podría indicar una contribución a la inhibición del desarrollo intracelular de los bacilos, esto también podría deberse a la existencia de una población supresora CD4⁺CD25⁺, estas células de tipo Treg podrían estar con el solo propósito de mantener la homeostasis de la respuesta inmune, pero también se ha observado que las células Treg despliegan una actividad inmune supresora, con mínima especificidad por el

antígeno, facilitando la persistencia de la bacteria. Algunos autores indican la participación de LT reguladores (LTreg) en la progresión de la patología hacia el estadio clínico. Estos Treg corresponden a los LT $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, que inducen una respuesta anti-inflamatoria mediante la secreción de IL-10 y del TGF- β (de Almeida y col. 2008; Coussens y col. 2012). Mientras que, Hoek y col. (2009) señalan que los LT $CD4^+CD25^+$ no muestran una actividad supresora en bovinos.

Cuando analizamos las citoquinas mayoritarias en el RAP y RBP pudimos observar aumento tanto de IFN- γ como de TNF- α en los rodeos infectados a los 16 y 18 meses de edad (Figura 35), este incremento en la expresión presento diferencias significativas en ambos tiempos entre ambos rodeos infectados observándose una mayor expresión en el RAP. También en ambos rodeos infectados se observó una mayor expresión IL-2. Esta respuesta es característica de un perfil Th1 de respuesta celular. Por lo tanto se evidencia que el RAP desarrolla una respuesta temprana al contacto con el patógeno, mediante mecanismos de activación de la subpoblación CD4 que produce mayor liberación de IFN- γ . Muchos estudios han reportado un aumento de IFN- γ asociado a la etapa subclínica de la enfermedad tanto en sangre periférica como en tejido (Sweeney y col. 1998; Coussens y col. 2004) pero también se han detectado niveles de IFN- γ en animales en estadio clínico de la enfermedad (Dudemaine y col. 2014). Se sabe que en estas infecciones intracelulares la presencia de IFN- γ produce la activación del macrófago para la eliminación del patógeno intracelular (Nacy & Diggs 1981; Bhardwaj y col. 1986), en el caso de Map en estadios subclínicos de la enfermedad, el aumento de IFN- γ se lo asocia con eliminación intermitente de Map en materia fecal (J. R. Stabel 2000), continuando con la progresión de la enfermedad.

Además observamos un aumento de TNF- α (Figura 35), inductor de la inflamación, el cual es producido por macrófagos y LT (Tizard 2013), el mismo podría estar expresado por macrófagos activados mediante la vía de señalización de PAMP a través de receptores TLR.

En cuanto a la IL-10, analizando la posibilidad de que las población $CD4^+CD25^+$ fueran Treg, según los resultados de expresión de esta citoquina podría existir la posibilidad ya que encontramos mayores valores en los rodeos infectados,

sin mostrar diferencias entre ellos. Estos valores de expresión fueron menores que los encontrados para IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Figura 35). En cuanto a la IL-10 tiene la capacidad de actuar directamente sobre el macrófago limitando la producción de citoquinas proinflamatorias y actuar directamente sobre los LT CD4⁺ inhibiendo la proliferación y producción de citoquinas (Couper y col. 2008). Existen trabajos donde comparan los niveles de IL-10 en los animales con la aparición de lesiones, y el mayor aumento lo encuentran en animales con lesiones (Shu y col. 2011).

También se observó en los animales pertenecientes a los rodeos infectados un incremento en la expresión de IL-17 (Figura 35). Dudemaine y col. (2014) sugieren la participación del LT helper 17 (LTh17) en la inflamación de tejidos producidos por la exposición a IL-17.

Se decidió evaluar las quemoquinas CXCL9 y CXCL10 ya que las mismas presentaron un aumento de expresión en los primeros estadios en granulomas en las infecciones por *M. tuberculosis* (Aranday-Cortes y col. 2013). En el caso de CXCL10 no fue posible detectar la expresión y para la quemoquina CXCL9 se observó un aumento leve que no presento diferencias estadísticamente significativas (Figura 35).

En cuanto a los linfocitos B pudimos observar que los mismos presentaron una marcada disminución en la frecuencia, tanto en el RAP y RBP respecto al rodeo negativo a los 18 meses de edad (Figura 34). Esta diferencia podría estar asociada a la madurez del sistema inmunológico de los animales o a la captación de los mismos en focos de infección, no permitiendo la disponibilidad a nivel de sangre periférica. Se pudo observar que cuando realizamos la estimulación de los rodeos con PPDA las células B no presentaron estimulación en concordancia con trabajos previos (Stabel y col. 2011).

Dada la heterogeneidad que comprenden los animales de cada grupo, ya que se pueden hallar en diferentes situaciones con respecto al contacto con el patógeno, nos centramos en las subpoblaciones de LT que presentaron activación, comarcadas con CD25⁺, agrupando a los animales en base a su serología (Figura 33C). Pudimos observar que un aumento significativo en el porcentaje de activación

de la subpoblación, WC1⁺ está presente en los animales que seroconvirtieron. Dentro de cada uno de los rodeos, tanto el RAP como RBP se observaron aumentos en la frecuencia de la población LTγδ. Esto ya fue reportados en varios trabajos previos (Koets y col. 2002; Badi y col. 2010). Esta subpoblación es considerada de importancia durante la respuesta innata frente a Map y otras micobacterias (Guzman y col. 2012; Plattner & Hostetter 2011). Se considera que la misma contribuye en la protección en los primeros estadios de la infección (Ziegler y col. 1994). Se ha observado en otras enfermedades que limitan el daño del tejido inflamatorio (Hsieh y col. 1996). El aumento de esta población en los animales que seroconvirtieron podría indicar la presencia de infección.

Cuando analizamos las otras poblaciones activadas no encontramos cambios que fueran estadísticamente significativos, pero en los animales pertenecientes al grupo SEROLOGIA- se evidenció un aumento de las poblaciones CD4⁺CD25⁺ y WC1⁺CD25⁺, el cual podría estar asociado a la protección frente a la infección.

También analizamos la expresión de citoquinas de los animales que tuvieron más de un diagnóstico positivo (no solo serología) y comparando con los animales que fueron negativos con los test de diagnósticos disponibles (Figura 36). Mediante el análisis de los animales individuales, observamos que los 5 animales infectados (A578, A596, A597, A587 y A579) presentaron mayores valores en la expresión IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-17. Pero cada uno de estos animales se caracterizó por el aumento de una citoquina diferente,

El animal A596, que presento diagnostico positivo en ELISA, IFN-γ, PCR y aumento de IgG2 muestra expresión aumentada con diferencias significativas en IL-17 y aumento de expresión IFN-γ (Figura 36 A, E). En el caso del animal A587 el cual resulto positivo a ELISA, PCR y aumento de IgG2 sin liberación de IFN-γ, presento el mismo patrón de citoquinas que el animal anterior, pero con un incremento adicional de TNF-α (Figura 36 A, B, E). En el caso del animal A597 el cual resultó positivo a ELISA, IFN-γ, PCR y aumento en IgG2 presentó expresión de IL-2 de forma constante con niveles menores en el resto de las citoquinas. El animal A578, que fue positivo al ELISA y a la liberación de IFN-γ, tuvo elevada expresión de IFN-γ y TNF-α. El animal A579 que fue positivo ELISA y PCR, tuvo elevada

expresión de TNF- α . La IL-10 mantuvo valores similares en todos los animales. El perfil observado en estos animales es tipo Th1 de respuesta celular caracterizado por la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-2, IFN- γ y TNF- α , acompañado de una respuesta inmune adaptativa Th17 la cual se la propone como un biomarcador de protección e infección en la respuesta inmune de la tuberculosis bovina (Waters y col. 2016). La IL-10 si bien mantuvo valores similares y no significativos entre animales, presentó mayor expresión en los animales infectados respecto a los animales ELISA negativo.

Estudios de inmunopatología de la paratuberculosis indican que en las infecciones paucibacilares, la enfermedad se asocia con una respuesta inflamatoria Th1/Th17, mientras que una fuerte respuesta Th2 se asocia con patologías multibacilares (Nicol et al 2016). Estos resultados y nuestros resultados indicarían que la presencia de IL-17 podría ser un posible biomarcador temprano de infección reciente en el caso de la paratuberculosis, el cual estaría acompañado de la expresión de IFN- γ , que también presentó aumento en su expresión en nuestro trabajo.

En base a estos resultados podemos observar la regulación positiva de un amplio número de citoquinas en los grupos infectados, incluyendo citoquinas asociadas tanto con respuestas inmunitarias del tipo Th1 y Th17, con poca participación de citoquinas inhibitoras como IL-10, en estas fases tempranas de la infección. Pero la diferencia observada en los diferentes animales infectados sugiere una respuesta inmune compleja y/o estamos evaluando animales que tuvieron contacto con la bacteria a diferente tiempo o con diferente carga bacteriana. Lo clásico en las infecciones por micobacterias es una transición gradual entre las respuestas inmunes Th1 y Th2, presentando inicialmente una respuesta Th1 con presencia de LT CD4⁺, los cuales generan IFN- γ que luego es reemplazado por una respuesta del tipo Th2, con producción de anticuerpos y expresión de IL-4 e IL-10 (Begg y col. 2011). En este estudio si bien fue evidente la respuesta Th1, con presencia de anticuerpos isotipo IgG2 y acompañada de respuesta Th17, la respuesta Th2 la evidenciamos por presencia de altos títulos de anticuerpos (ver resultados de diagnóstico de los terneros). Sin embargo si observamos la expresión de IL-10 e

IL-4 esta es solo incipiente en los terneros de esa edad. Por lo tanto podemos ver que en paratuberculosis las respuestas Th1/Th17 y Th2 puede superponerse a partir del primer año de vida de los animales expuestos en rodeos con alta prevalencia. Si analizamos la respuesta Th2 por el nivel de anticuerpos, esta respuesta precede a la respuesta celular en paratuberculosis.

TERCERA PARTE

GENOTIPIFICACIÓN DE

AISLAMIENTOS DE MAP MEDIANTE

MIRU-VNTR

Se realizó la genotipificación de las cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante MIRU-VNTRs, de los aislamientos realizados de los campos de las localidades de donde procedían los rodeos del presente estudio (aislamientos correspondientes a la localidad de Tandil y Luján). También se genotipificaron aislamientos de otras localidades cercanas (Santa Catalina, Pehuén, Gral. Belgrano, Chascomús, Castelli, Vieytes, Batio y Lomas de Zamora) para realizar una comparación entre los genotipos y evaluar la prevalencia de los mismos en la región de estudio (Figura 37).

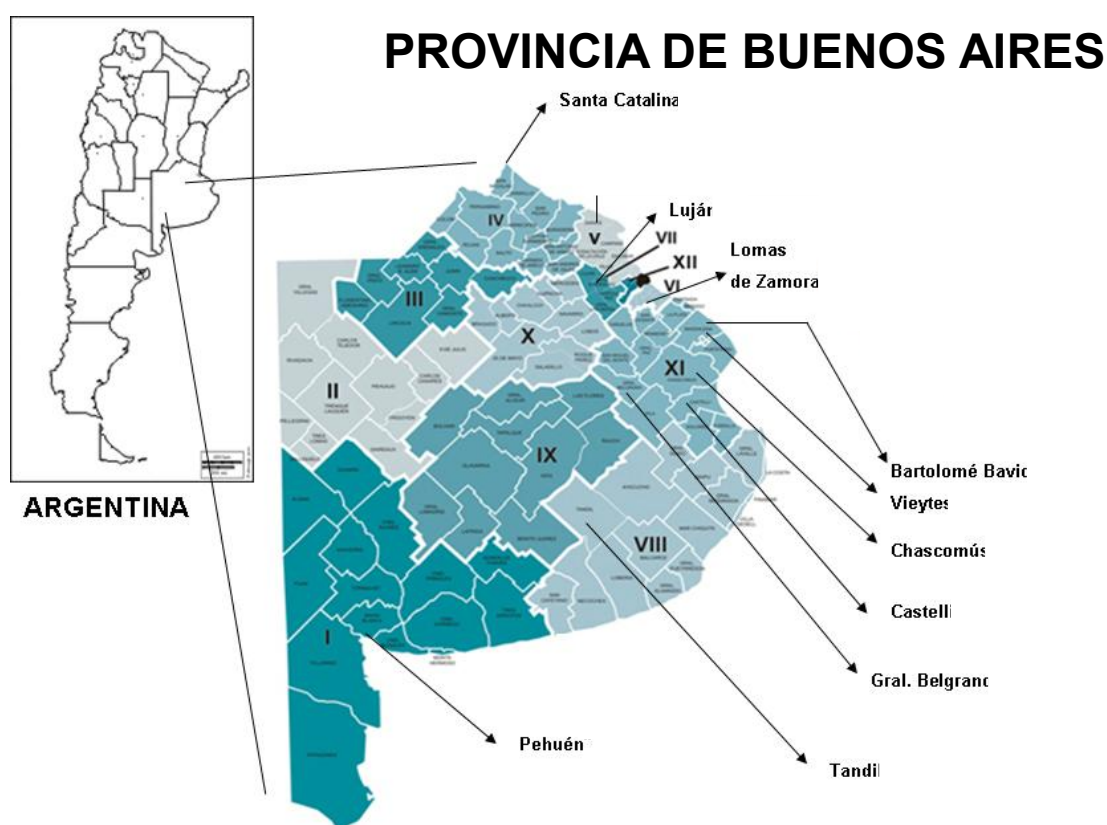


Figura 37: Mapa de la Provincia de Buenos Aires con las zonas geográficas de los aislamientos de Map.

INMV	292	X3	25	47	3	7	10	32	Carabana	Localizacion	Pais	MAC
1	4	2	3	3	2	2	2	8	5716	TANDIL	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	6231	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	6236	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	5716	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	168	Vieytes	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4653	Vieytes	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4695	Vieytes	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4718	Lujan	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4725	Lujan	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4740	Lujan	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4002	Lujan	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	6136	Lujan	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4468	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	4752	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	1519/13	Castelli	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	P.292/12-A491	Castelli	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	MI	G. Belgrano	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	p.5068	Chascomus	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	P.3663 A069	Pehuen	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	A172	TANDIL	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	P.5360	S. Catalina	Argentina	MAP
1	4	2	3	3	2	2	2	8	1515	Bme Bavio	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	1368/5887	Chascomus	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	4721	Vieytes	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	3222	Lujan	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	A037	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	3222	Chascomus	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	6605	Chascomus	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	K-10*		Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	A109	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	6038	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	A213	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	A046	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	B826	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	A178	TANDIL	Argentina	MAP
2	3	2	3	3	2	2	2	8	P.3251	Bme Bavio	Argentina	MAP
5	4	2	3	3	2	2	1	8	A021	TANDIL	Argentina	MAP
8	3	2	3	3	2	3	2	8	B622 (1 col)	TANDIL	Argentina	MAP
8	3	2	3	3	2	3	2	8	4655	Chascomus	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A021 P	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	8624	Lujan	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	6611	Chascomus	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A077	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A272	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A255 (1 col)	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A199 (1 col)	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A299 (1 col)	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A067(3/13)	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A250	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A267	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A279	TANDIL	Argentina	MAP
11	3	2	3	3	2	4	2	8	A589	TANDIL	Argentina	MAP

Tabla 8: Genotipos encontrados en las diferentes localidades con los locus (MIRU-VNTR) estudiados, expresando la clasificación INMV (serie de genotipos) según la estandarización sugerida por Thibault 2004.

INMV	Repeticiones en MIRU-VNTR								Aislados N (%)	Área geográfica
	292	X3	25	47	3	7	10	32		
1	4	2	3	3	2	2	2	8	27 (44.2)	Tandil, Chascomús, Vieytes, Luján, Castelli, Gral. Belgrano, Pehuén, Santa Catalina, Bme Bavio
2	3	2	3	3	2	2	2	8	17 (27.9)	Tandil, Chascomús, Vieytes, Luján, L. de Zamora, Bme Bavio
5	4	2	3	3	2	2	1	8	2 (3.3)	Tandil, L. de Zamora
8	3	2	3	3	2	4	2	8	2 (3.3)	Tandil, Chascomús
11	3	2	3	3	2	3	2	8	13 (21.3)	Tandil, Luján, L. de Zamora, Chascomús

Tabla 9: Prevalencias encontradas según la clasificación INMV expresada en porcentajes según la estandarización sugerida por Thibault 2004.

Diversidad Alélica (D)										
Loci	292	X3	25	47	3	7	10	32	HGDI	MAC
	0,505	0	0	0	0	0,698	0,0645	0	0,6984	MAP

Tabla 10: Diversidad alélica (D) para cada uno de los locus utilizados.

En base a los resultados obtenidos de los MIRU-VNTR (Tabla 8) se realizaron los distintos análisis filogenéticos mediante diferentes métodos algorítmicos. El primer método utilizado fue el Método Grupos pareados, no asociado, con la media aritmética (UPGMA) en dendogramas con matrices de distancia que contienen las diferencia por pares de perfiles alélicos. Este tipo de análisis permite obtener resultados globales mediante la asociación de grupos de genotipos relacionándolos entre ellos, pero frecuentemente no refleja la línea originaria de la descendencia. Se puede observar que la bifurcación de los arboles representa la relación entre los distintos genotipos pero se pierde la historia de la evolución y puede llegar a despreciar o confundir los efectos de la recombinación, si es que estas fueron el origen de los cambios en los genotipos (Figura 38).

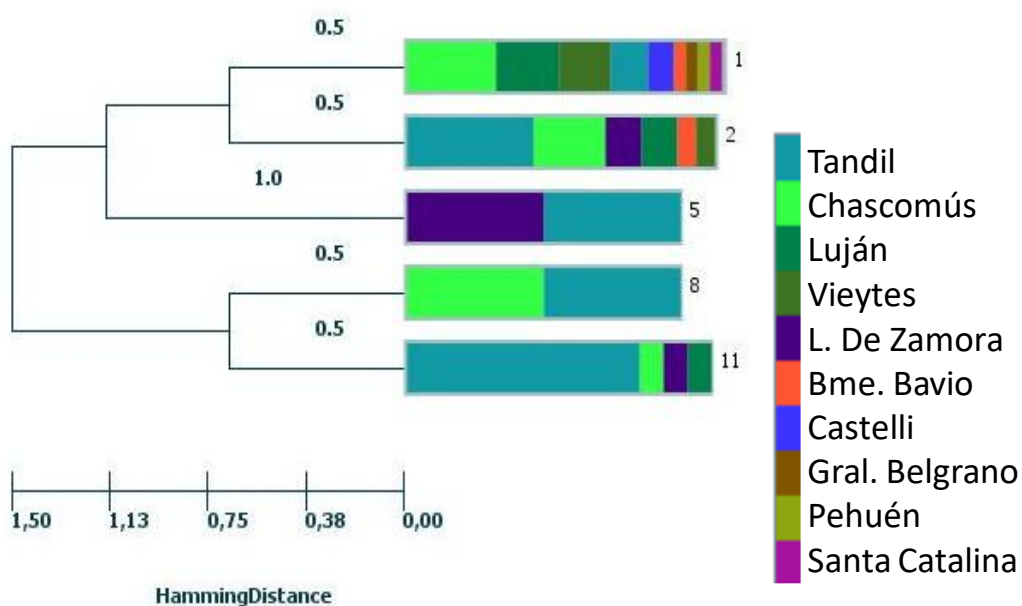


Figura 38: Muestra los INMV encontrados (INMV: 1, 2, 5, 8,11), distribuidos según la localidad a la que pertenecían los aislamientos genotipificados, distribuidos en un Dendograma UPGMA realizado mediante el software PHILOViZ.

Para profundizar el estudio de los genotipos descriptos anteriormente se decidió realizar otro análisis del algoritmo de Kruscall (goeBURST), este provee un análisis exhaustivo de la base biológica de la información existente y lo compara frente a otros métodos. La información se presenta mediante gráficos circulares cuyas distancias representan de forma proporcional la evolución (Figura 39).

En base a estos análisis podemos observar la presencia de un linaje principal (INMV 2) del cual evolucionan las cuatro variantes presentes en nuestro país.

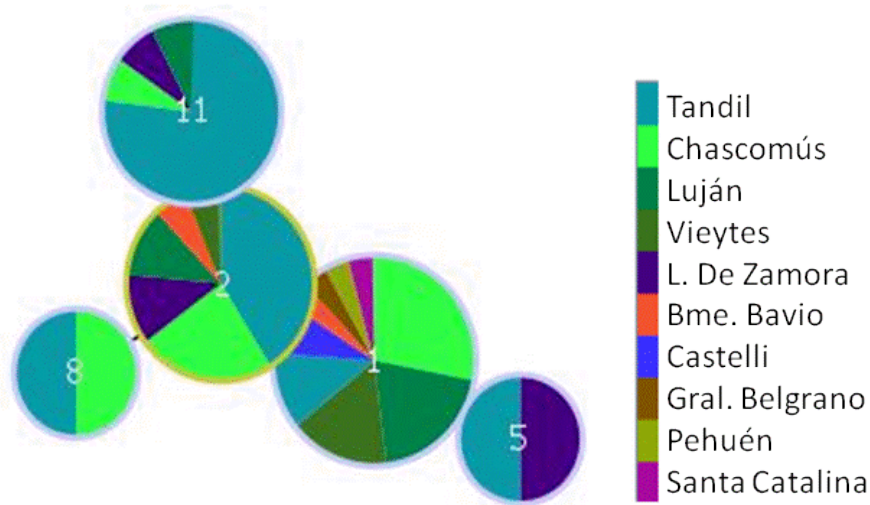


Figura 39: Esquema goeBURST realizado mediante Philoviz en base a los aislamientos en análisis.

Estos patrones de INMV fueron descriptos previamente por Thimbault. y reportados en nuestro país en trabajos previos (Gioffré y col. 2015).

En cuanto al aislamiento obtenido del seguimiento del RAP del animal A589, el mismo se logró genotipificar detectándose que correspondía al INMV 11 este animal desarrollo respuesta humoral de forma temprana, presentando signos clínicos a los 15 meses generándole la muerte por lo cual no pudo seguirse en este estudio.

Cuando analizamos los resultados de los aislamientos obtenidos en el campo de estudio (RAP, Tandil) en nuestro trabajo comparados con resultados previos de de genotipificación realizado por nuestro grupo, vemos que dentro de los más frecuentemente encontrados están el INMV 1 (44.2%) y INMV 2 (27.9%), seguidos por INMV 11 (21.3%), INMV 8 (3.3%) y INMV 5 (3.3%). Esta técnica mostró un índice discriminatorio de Hunter y Gaston (HGDI: 0.6984). Dentro de los marcadores utilizados encontramos que el marcador 7 y 292 mostró la mayor diversidad alélica (D): 0.698 y 0.505, el marcador de 10 demostró una baja D (0.0645), mientras que loci X3, 25, 47, 3 y 32 no mostraron ninguna variabilidad (Tabla 10).

Esto indicaría que los 3 loci 7, 292 y 10 podrían utilizarse en un panel reducido para genotipificar aislamientos de Map, incorporando el loci 25 ya que en otros aislamientos del país presentó poder de discriminación (D).

DISCUSIÓN

TERCER PARTE

Los métodos de genotipificación basados en PCR son una forma simplificada de genotipificar los microorganismos. En el caso de las micobacterias presentan loci VNTR, los cuales son secuencias de ADN repetidas en forma de tándem, dentro de los cuales contienen elementos genéticos llamados MIRUs (Unidades repetitivas intercaladas) que se encuentran principalmente en las regiones intergénicas dispersas por todo el genoma de las micobacterias (Supply y col. 2000; Supply y col. 1997). Los MIRUs a su vez se dividen en tres grupos en base a su secuencia, organización y longitud. La técnica de MIRU-VNTR es fácil de realizar y requiere baja cantidad de ADN. La misma fue útil para describir la diversidad genética presente entre los aislamientos de Map estudiados. Por otra parte, se obtuvo un aceptable índice discriminatorio HGDI=0.6984 para Map y resultó concordante con los reportados por otros autores (Gioffré y col. 2015; N Radomski y col. 2010).

Los patrones de INMV obtenidos en el estudio pudieron compararse con los registrados en la base de datos de MAC-INMV gratuita del INRA, Francia (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>), el cual se realiza con el esquema de ocho loci MIRU-VNTR (7, 292, 10, X3, 25, 47, 3 y 32).

De acuerdo con el valor de D obtenido para cada locus y la HGDI global se podría trabajar con un esquema acortado para realizar la genotipificación de los aislamientos de Map. Este esquema puede incluir sólo 4 loci (7, 292, 10 y 25) en base al índice obtenido para cada uno de los locus obtenidos (Tabla 10) indicando que en nuestro caso el loci 25 no mostró variabilidad en base a los INMV obtenidos, pero en trabajos previos de Argentina se encontró el INVV 33 en el cual varía en el loci 25 (Gioffré y col. 2015).

Además, se ha reportado el uso de MIRU-VNTR combinado con un segundo método, tales como los polimorfismos presentes en multilocus de secuencia corta repetida (MLSSR) para mejorar la calidad del genotipado de Map obteniendo una

alta resolución, adicionando poder discriminatorio (Thibault y col. 2008; Amonsin y col. 2004). La adición de otra técnica de genotipado utilizando diferentes marcadores genéticos discriminatorios podría mejorar la clasificación de los aislamientos. A pesar de que la genotipificación por MIRU-VNTR es una forma sencilla de tipificar aislamientos de Map, utilizar solo este método de tipificación ha sido cuestionado por algunos autores, los cuales encontraron que si comparan la secuenciación completa del genoma y los datos aportados por los VNTR, puede producirse con estos últimos una incorrecta valoración de la diversidad y relación de cepas (Bryant y col. 2016). Esta técnica puede sobreestimar o subestimar la relación entre cepas debido a la inestabilidad de algunos elementos repetitivos en el genoma y la ocurrencia de homoplasia (Francisco y col. 2009), que es la aparición de genotipos que son idénticos por cambios evolutivos análogos, pero los organismos han evolucionado de manera independiente. Para estos organismos subyacen mecanismos comunes en el plano genético molecular que pueden ser por la transferencia horizontal de genes y/o por evolución convergente y reversa, pero no están relacionados genéticamente entre ellos (Ahlstrom y col. 2015; Bryant y col. 2016).

En base a los resultados los principales patrones encontrados entre los aislamientos estudiados de Map fueron INMV 1 y 2. Estos resultados son concordantes con los previamente reportados como los más prevalentes en diversas partes del mundo (Thibault y col. 2007; Gioffré y col. 2015). La prevalencia reportada por la base de datos de MAC INMV para los patrones más comunes fueron INMV 1, 27.92% y INMV 2, 23.71% (http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php?p=fa_db). En nuestro caso fueron INMV 1, 44.2% y INMV 2, 27.9%, teniendo mayor relevancia el INMV 1, datos publicados recientemente por nuestro grupo.

En cuanto al único aislamiento obtenido del presente trabajo, del animal A589 de RAP, el mismo resultó agruparse en el INMV 11, dato que no fue posible comparar con el aislamiento de su madre, ya que fue negativa al cultivo, por lo cual no podemos evaluar si podría existir una transferencia del agente en el momento del parto y/o fecal oral. Si es posible indicar que esté INMV fue encontrado previamente y descrito en animales adultos del mismo rodeo. En base a los aislamientos en el RAP, Tandil, se calcularon las prevalencias de los diferentes genotipos, y nuestro

aislamiento se agrupó en el patrón de mayor prevalencia (47,8%) INMV 11, seguido por INMV 2 (30.4%), INMV 1 (13%) y los INMV 5 y 8 (4.4%).

Se seleccionó este método de tipificación inicial en el presente estudio por la simplicidad y la estandarización que existe con la base de datos aportada por INRA que permite comparar los patrones encontrados con los que existen en otras partes del mundo. De esta forma el análisis de los mismos permitió describir la diversidad de las cepas de Map en los rodeos en estudio. Además, los mismos presentaron concordancia con trabajos anteriores realizados en Argentina (Gioffré y col. 2015) en los cuales se utilizó el mismo método.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis se pudo concluir los siguientes ítems:

- Se encontró un predominio de respuesta inmune humoral en animales jóvenes nacidos en los rodeos infectados, mientras que la respuesta celular medida por liberación de IFN- γ e intradermorreacción no fue predominante en estos animales.
- La presencia de anticuerpos isotipo IgG2 podría ser un marcador de enfermedad encontrándose en suero de animales jóvenes de forma temprana.
- La utilización de fagos modificados con un fluoroforo seria un potencial diagnostico para la determinación de micobacterias viables de forma rápida.
- La activación de linfocitos gamma delta (WC1+) se encuentra aumentada en los animales de los rodeos infectados con presencia de respuesta humoral.
- Niveles de expresión altos de IFN- γ , IL-2 e IL-17, se destacan en los animales que se logro obtener un diagnostico positivo a paratuberculosis bovina.

- Se observó una respuesta combinada Th1/Th17 y Th2, en animales que presentaron diagnóstico temprano de infección, asociado a la expresión aumentada de citoquinas pro inflamatorias y en menor medida la expresión de IL-10.
- Fue posible confirmar la presencia de diferentes genotipos de Map, aumentando la descripción de las características genómicas de los aislamientos en la Provincia de Buenos Aires.
- Los datos obtenidos en el presente estudio servirán como antecedentes descriptivos de la patogenia de la enfermedad en animales jóvenes infectados naturalmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, B. & Riemann, H.P., 1988. IgG, IgM and IgA in the serum of cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 11(3-4), pp.171-5.
- Ahlstrom, C. y col., 2015. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on a national and herd level. *BMC Genomics*, 16(1), p.161.
- Al-Shamali, M. y col., 1997. A multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 32(8), pp.819-23.
- Albert, M.L., Sauter, B. & Bhardwaj, N., 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392(6671), pp.86-9.
- Alinovi, C.A. y col., 2009. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), pp.177-179.
- de Almeida, D.E., Colvin, C.J. & Coussens, P.M., 2008. Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(3-4), pp.234-245.
- Alvarado Pinedo, F. Posibilidades diagnósticas de la PPD aviar en la paratuberculosis bovina en animales jóvenes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2015.
- Amonsín, A. y col., 2004. Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), pp.1694-702.
- Aranday-Cortes, E. y col., 2013. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in Early-Stage Granulomas Induced by *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(6), pp.525-537.
- Badi, F.A., Haroon, A.I. Al & Alluwaimi, A.M., 2010. The gammadelta cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Research in veterinary science*, 88(1), pp.72-6.
- Bannantine, J.P. y col., 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), pp.1303-10.
- Baquero, M.M. & Plattner, B.L., 2016. Bovine WC1+ $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 170, pp.65-72.
- Bartos, M. y col., 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *Journal of microbiological methods*, 64(3), pp.333-45.
- Basra, S. y col., 2014. Isolation and characterization of a novel bacteriophage against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Archives of Virology*, 159(10), pp.2659-2674.
- Bauerfeind, R. y col., 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *Journal of clinical microbiology*, 34(7), pp.1617-21.
- Begg, D.J. y col., 2011. Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology*, 216(7), pp.840-846.
- Belkaid, Y. & Rouse, B.T., 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*, 6(4), pp.353-360.
- Bembridge, G.P. y col., 1995. CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function. *Immunology*, 86(4), pp.537-44.
- Bernardelli, A. y col., 2002. Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. , 58.
- Bhardwaj, N., Nash, T.W. & Horwitz, M.A., 1986. Interferon-gamma-activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 137(8), pp.2662-9.
- Biet, F. y col., 2012. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC microbiology*, 12, p.264.

- Biet, F. y col., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAC). *Veterinary Research*, 36(3), pp.411-436.
- Blanco, F.C. y col., 2009. Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiology and immunology*, 53(8), pp.460-7.
- Boddinghaus, B. y col., 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), pp.1751-1759.
- Botsaris, G. y col., 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *International Journal of Food Microbiology*, 216, pp.91-94.
- Brennan, P.J. & Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64, pp.29-63.
- Bryant, J.M. y col., 2016. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *BMC genomics*, 17(1), p.79.
- Buergelt, C.D. & Ginn, P.E., 2000. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). *Veterinary Microbiology*, 77(3), pp.325-331.
- Bull, T.J. y col., 2000. Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (mpa) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 77(3-4), pp.453-63.
- Bull, T.J. y col., 2003. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium complex*. *Molecular and Cellular Probes*, 17(4), pp.157-164.
- Burrells, C. y col., 1999. Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Veterinary immunology and immunopathology*, 68(2-4), pp.139-48.
- Butler, J.E., 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Veterinary immunology and immunopathology*, 4(1-2), pp.43-152.

- Buza, J. y col., 2009. Vaccination of calves with *Mycobacteria bovis* Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood gammadelta T cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 130(3-4), pp.251-5.
- Castellanos, E. y col., 2009. Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *Journal of clinical microbiology*, 47(7), pp.2260-4.
- Chase, C.C.L., Hurley, D.J. & Reber, A.J., 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 24(1), pp.87-104.
- Cheville, N.F. y col., 2001. Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 108(6), pp.236-43.
- Chiodini, R.J., Chamberlin, W.M. & Pfaller, S., 2011. What is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*? *Applied and environmental microbiology*, 77(5), pp.1923-4-4.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. & Merkal, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell veterinarian*, 74(3), pp.218-62.
- Choy, E. y col., 1998. A method for purification and characterisation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the intestinal mucosa of sheep with Johne's disease. *Veterinary microbiology*, 64(1), pp.51-60.
- Cirone, K. y col., 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, pp.57-68.
- Clarke, C.J., 1994. Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/M. *avium* infection. En United Kindon: Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis, p. 17; 345-365.
- Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, 116(3), pp.217-61.
- Cocito, C. y col., 1994. Paratuberculosis. *Clinical microbiology reviews*, 7(3), pp.328-45.

- Collins, D.M., Hilbink, F., y col., 1993. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *The Veterinary record*, 133(24), pp.599-600.
- Collins, D.M., Cavaignac, S. & de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium complex* isolated from animals. *Molecular and cellular probes*, 11(5), pp.373-80.
- Collins, D.M., Gabric, D.M. & de Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 28(7), pp.1591-6.
- Collins, D.M., Stephens, D.M. & de Lisle, G.W., 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary microbiology*, 36(3-4), pp.289-99.
- Collins, M.T. y col., 1996. Diagnosis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), pp.357-371.
- Collins, M.T., 2011. Diagnosis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(3), pp.581-591.
- Collins, M.T. y col., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(6), pp.685-92.
- Collins, T.F., 1990. Diagnosis of tuberculosis. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 78(12), pp.761-2.
- Costa, E. y col., 2004. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Revista de Medicina Veterinaria*, 85, pp.16-22.
- Costanzo, G. y col., 2012. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary microbiology*, 156(1-2), pp.183-8.
- Coulombe-Huntington, J. & Majewski, J., 2007. Characterization of intron loss events in mammals. *Genome research*, 17(1), pp.23-32.
- Council, N.R., 2003. *Diagnosis and Control of Johne's Disease*, Washington, D.C.: National Academies Press.

- Couper, K.N., Blount, D.G. & Riley, E.M., 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9).
- Coussens, P.M. y col., 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun*, 72(3), pp.1409-1422.
- Coussens, P.M. y col., 2012. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(3), pp.233-239.
- Deka, R. y col., 1992. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations. *American journal of human genetics*, 51(6), pp.1325-33.
- Djønne, B. y col., 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Veterinary microbiology*, 92(1-2), pp.135-43.
- Doran, T.J. y col., 1994. Putative functional domain within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. *Immunology and cell biology*, 72(5), pp.427-34.
- Dudemaine, P.L. y col., 2014. Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *Journal of dairy science*, 97(6).
- Dundee, L. y col., 2001. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Letters in applied microbiology*, 33(3), pp.173-7.
- Dupont, 1915. Nota jornal do comercio. *Jornal do comercio*, p.8.
- Eda, S. y col., 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13(8), pp.837-44.
- Eda, S. y col., 2005. New Method of Serological Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's Disease) by Flow Cytometry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(3), pp.250-262.

- Ellis, T.N. & Beaman, B.L., 2004. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1), pp.2-12.
- Englund, S. y col., 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary microbiology*, 81(3), pp.257-71.
- Englund, S. y col., 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33(3), pp.163-171.
- Englund, S., Bölske, G. & Johansson, K.E., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS microbiology letters*, 209(2), pp.267-71.
- Estes, D.M. & Brown, W.C., 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 90(1-2), pp.1-10.
- Fang, Y. y col., 2002. Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), pp.287-91.
- Feng, C.G. y col., 1999. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 67(7), pp.3242-7.
- Fernández-Silva, J.A., Correa-Valencia, N.M. & Ramírez, N.F., 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical animal health and production*, 46(8), pp.1321-40.
- Fernandez, B. *Respuesta inmune humoral inducida por proteínas de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en bovinos*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Univirsidad de Buenos Aires. 2016
- Flynn, J.L. & Chan, J., 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*, 19, pp.93-129.
- Foddai, A. y col., 2011. Application of a Peptide-Mediated Magnetic Separation-Phage Assay for Detection of Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to Bovine Bulk

- Tank Milk and Feces Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), pp.2017-2019.
- Foddai, A., Elliott, C.T. & Grant, I.R., 2009. Optimization of a Phage Amplification Assay To Permit Accurate Enumeration of Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), pp.3896-3902.
- Francisco, A.P. y col., 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC bioinformatics*, 10(1), p.152.
- Garrido, J. y col., 2000. *Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis*,
- van der Giessen, J.W. y col., 1992. Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *Journal of clinical microbiology*, 30(5), pp.1216-9.
- Gioffré, A. y col., 2015. Molecular typing of Argentinian *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp.557-564.
- Glanemann, B. y col., 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 146(9), pp.409-415.
- Gollnick, N.S. y col., 2007. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Veterinary immunology and immunopathology*, 120(3-4), pp.93-105.
- Gomez, J.E. & McKinney, J.D., 2004. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*, 84(1-2), pp.29-44.
- Gonda, M.G. y col., 2007. Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Animal Genetics*, 38(4), pp.389-396.
- González, J. y col., 2005. Histopathological Classification of Lesions associated with Natural Paratuberculosis Infection in Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2), pp.184-196.

- Green, E.P. y col., 1989. Insertion elements in mycobacteria. *Acta leprologica*, 7 Suppl 1, pp.239-42.
- Greig, A. y col., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), pp.1746-51.
- Griffin, J.F.T. y col., 2005. Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(12), pp.1401-9.
- Gunnarsson, E. & Fodstad, F.H., 1979. Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta veterinaria Scandinavica*, 20(1), pp.122-34.
- Guzman, E. y col., 2012. Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1-2), pp.161-167.
- Gwozdz, J.M. y col., 2000. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Australian veterinary journal*, 78(11), pp.779-83.
- Gwóźdz, J.M. y col., 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 57(2-3), pp.233-244.
- Harris, N.B. & Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), pp.489-512.
- Hedges, J.F., Lubick, K.J. & Jutila, M.A., 2005. Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(10), pp.6045-53.
- Herthnek, D. & Bölske, G., 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC microbiology*, 6, p.87.
- Hett, E.C. & Rubin, E.J., 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 72(1), p.126-156, table of contents.
- Hines, M.E. y col., 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: A review and

- proposed international guidelines. *Veterinary Microbiology*, 122(3), pp.197-222.
- Hoek, A. y col., 2009. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Veterinary Research*, 40.
- Hoffmann, C. y col., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), pp.3963-7.
- Hope, A.F. y col., 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Australian veterinary journal*, 78(12), pp.850-6.
- Horsburgh, C.R. y col., 2001. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(11), pp.1938-43.
- Hostetter, J.M. y col., 2002. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS immunology and medical microbiology*, 34(2), pp.127-34.
- Hsieh, B. y col., 1996. In vivo cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by gamma delta+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(1), pp.232-7.
- Huda, A. y col., 2003. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 94(3-4), pp.95-103.
- van Hulzen, K.J.E. y col., 2011. Different *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MIRU–VNTR patterns coexist within cattle herds. *Veterinary Microbiology*, 148(2-4), pp.419-424.
- van Hulzen, K.J.E. y col., 2012. Genetic variation for infection status as determined by a specific antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 95(10), pp.6145-6151.
- van Hulzen, K.J.E. y col., 2014. The effect of genetic selection for Johne's disease resistance in dairy cattle: Results of a genetic-epidemiological model. *Journal of Dairy Science*,

97(3), pp.1762-1773.

Hunter, P.R. & Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*, 26(11), pp.2465-6.

Imperiale, B. y col., 2012. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Revista Argentina de microbiología*, 44(1), pp.3-9.

Inderlied, C.B., Kemper, C.A. & Bermudez, L.E., 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(3), p.266.

Irenge, L.M. y col., 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Veterinary microbiology*, 136(1-2), pp.166-72.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L., 1985. Individual-specific «fingerprints» of human DNA. *Nature*, 316(6023), pp.76-9.

Johansen, T.B. y col., 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in swine associated with peat used for bedding. *BioMed research international*, 2014, p.189649.

de Juan, L. y col., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 106(3-4), pp.249-257.

Jubb, T.F. y col., 2004. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian veterinary journal*, 82(9), pp.569-73.

Juste, R.A. y col., 2005. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17(4), pp.354-9.

Kacskovics, I., 2004. Fc receptors in livestock species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(4), pp.351-362.

Kaevska, M. y col., 2014. Microscopy, culture, and quantitative real-time PCR examination

- confirm internalization of mycobacteria in plants. *Applied and environmental microbiology*, 80(13), pp.3888-94.
- Kalis, C.H.J. y col., 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology*, 97(1), pp.73-86.
- Kaur, P. y col., 2010. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Tropical animal health and production*, 42(5), pp.1031-5.
- Kawaji, S. y col., 2012. Detection of antibody responses against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* stress-associated proteins within 30 weeks after infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150(1-2), pp.101-111.
- Kawaji, S. y col., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary Microbiology*, 125(1), pp.36-48.
- Keim, P. y col., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology*, 182(10), pp.2928-36.
- Kennedy, H.E. y col., 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infection and immunity*, 70(3), pp.1488-500.
- Khalifeh, M.S. & Stabel, J.R., 2004. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infection and immunity*, 72(4), pp.1974-82.
- Koets, A. y col., 2006. Mycobacterial 70kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*, 24(14), pp.2550-2559.
- Koets, A. y col., 2002. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infection and immunity*, 70(7), pp.3856-64.
- Koets, A.P. y col., 2001. Differential Changes in Heat Shock Protein-, Lipoarabinomannan-, and Purified Protein Derivative-Specific Immunoglobulin G1 and G2 Isotype Responses

- during Bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection. *Infection and immunity*, 69(3), pp.1492-1498.
- Körmendy, B., 1988. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta veterinaria Hungarica*, 36(3-4), pp.177-83.
- Larsen, A.B., Merkal, R.S. & Vardaman, T.H., 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, 17(64), pp.549-51.
- Lepper, A.W. y col., 1989. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Australian veterinary journal*, 66(2), pp.50-5.
- Li, L. y col., 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), pp.12344-12349.
- Liébana, E. y col., 1999. Generation of CD8(+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infection and immunity*, 67(3), pp.1034-44.
- Lilenbaum, W. y col., 1999. Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Veterinary Science*, 66, pp.191-195.
- Lindstedt, B.-A., 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26(13), pp.2567-2582.
- Magnano, G.G. y col., 2009. Investigación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche ultrapasteurizada para consumo humano. *InVet*, 11(2), pp.93-97.
- Magnano G y col., 2002. Evaluación serológica de Paratuberculosis en el sudoeste de la Provincia de Cordoba, Argentina. *Veterinaria Argentina*, XIX(190), pp.741-746.
- Magombedze, G., Eda, S. & Ganusov, V. V, 2014. Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants. *PLoS computational biology*, 10(1), p.e1003414.

- Malaga, W. y col., 2008. Deciphering the genetic bases of the structural diversity of phenolic glycolipids in strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The Journal of biological chemistry*, 283(22), pp.15177-84.
- Manning, E.J. & Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), pp.133-50.
- Marri, P.R., Bannantine, J.P. & Golding, G.B., 2006. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS microbiology reviews*, 30(6), pp.906-25.
- Martinis Mercado, D. y col., 2002. La Paratuberculosis y los bovinos lecheros de la provincia de Corrientes. *Comunicaciones científicas sesiones anuales, Fac. Cs. Vet. UNNE*, 59.
- McDonald, W.L. y col., 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian veterinary journal*, 77(2), pp.113-9.
- McDonough, K.A., Kress, Y. & Bloom, B.R., 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infection and immunity*, 61(7), pp.2763-73.
- McFadden, J.J. y col., 1987. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular microbiology*, 1(3), pp.283-91.
- Merkal, R.S. y col., 1968. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: histochemical localization of hydrolase activities. *American journal of veterinary research*, 29(5), pp.985-94.
- Miller, J. y col., 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 9(3), pp.244-9.
- Miller, J.M., Jenny, A.L. & Ellingson, J.L., 1999. Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 11(5), pp.436-40.

- Mitchell, R.M. y col., 2012. A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiology and Infection*, 140(2), pp.231-246.
- Möbius, P., Hotzel, H., y col., 2008. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 126(4), pp.324-33.
- Möbius, P., Luyven, G., y col., 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem. *Journal of clinical microbiology*, 46(3), pp.972-81.
- Momotani, E. y col., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary pathology*, 25(2), pp.131-7.
- Mon, M.L. y col., 2014. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of mycobacterium bovis for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *BioMed Research International*.
- Moravkova, M. y col., 2013. Genetic IS901 RFLP diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates from four pheasant flocks. *Journal of veterinary science*, 14(1), pp.99-102.
- Moreira, A., Spath, E. & Morsella, C., 1994. Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter*, 6, p.18.
- Mortier, R.A., Barkema, H.W., Negron, M.E., y col., 2014. Antibody response early after experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97(9), pp.5558-5565.
- Mortier, R.A., Barkema, H.W., Wilson, T.A., y col., 2014. Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 161(3-4), pp.205-10.
- Mortier, R.A. y col., 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Veterinary Research*, 44(1), p.94.

- Mortier, R.A.R. y col., 2015. Longitudinal evaluation of diagnostics in experimentally infected young calves during subclinical and clinical paratuberculosis. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 56(12), pp.1266-70.
- Mundo, S.L. y col., 2008. Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Veterinary Research*, 39(1), p.6.
- Nacional de Sanidad Calidad Agroalimentaria Derivado Proteico Purificado, S., Producción y control de tuberculina bovina y aviar.
- Nacy, C.A. & Diggs, C.L., 1981. Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. *Infection and immunity*, 34(1), pp.310-3.
- Nielsen, S.S. y col., 2001. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 13(2), pp.164-6.
- Nielsen, S.S. & Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129(3-4), pp.217-235.
- Nightingale, S.D. y col., 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *The Journal of infectious diseases*, 165(6), pp.1082-5.
- Olsen, I. y col., 2005. Bovine NK Cells Can Produce Gamma Interferon in Response to the Secreted Mycobacterial Proteins ESAT-6 and MPP14 but Not in Response to MPB70. *Infection and Immunity*, 73(9), pp.5628-5635.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, 2016. *OIE-Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2016*,
- Osterstock, J.B. y col., 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6), pp.896-901.

- Ott, S.L., Wells, S.J. & Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive veterinary medicine*, 40(3-4), pp.179-92.
- Overduin, P. y col., 2004. Use of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), pp.5022-5028.
- Ozbek, A. y col., 2003. Evaluation of two recovery methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR: direct-dilution--centrifugation and C(18)-carboxypropylbetaine processing. *FEMS microbiology letters*, 229(2), pp.145-51.
- Paolicchi, F. y col., 2001. Diagnóstico de Paratuberculosis en bovinos de rodeo lechero. En *XXI World Buiatrics Congress, Uruguay*.
- Paolicchi, F.A. y col., 2001. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an immunohistochemical study. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48(4), pp.313-20.
- Passucci, J. y col., 2007. Análisis económico del saneamiento de paratuberculosis en un rodeo de cría bovina. *Revista Argentina de Producción Animal.*, 27(1), pp.337-338.
- Paustian, M.L. y col., 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC genomics*, 9, p.135.
- Pavlic, M. y col., 1999. Simultaneous infection with two drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains in an immunocompetent host. *Journal of clinical microbiology*, 37(12), pp.4156-7.
- Pavlik, I. y col., 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of microbiological methods*, 38(1-2), pp.155-67.
- Plain, K.M. y col., 2011. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan catabolism, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a model for chronic mycobacterial infections. *Infection and immunity*, 79(9), pp.3821-32.
- Plante, Y. y col., 1996. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 60(2), pp.115-20.

- Plattner, B.L. y col., 2014. T lymphocyte responses during early enteric *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157(1-2), pp.12-19.
- Plattner, B.L. & Hostetter, J.M., 2011. Comparative Gamma Delta T Cell Immunology: A Focus on Mycobacterial Disease in Cattle. *Veterinary Medicine International*, 2011, pp.1-8.
- Plattner, B.L., Huffman, E.L. & Hostetter, J.M., 2013. Gamma-delta T-cell responses during subcutaneous *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* challenge in sensitized or naive calves using matrix biopolymers. *Veterinary pathology*, 50(4), pp.630-7.
- Pollock, J.M. y col., 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology*, 87(2), pp.236-41.
- Pollock, J.M. y col., 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81(1-2), pp.103-107.
- Portaels, F., Van den Breen, L. & Pattyn, S.R., 1982. Sensitivity of mycobacteria to dapsone. *Arzneimittel-Forschung*, 32(9), pp.1124-1125.
- Primm, T.P., Lucero, C.A. & Falkinham, J.O., 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), pp.98-106.
- Prinzis, S., Chatterjee, D. & Brennan, P.J., 1993. Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of general microbiology*, 139(11), pp.2649-2658.
- Qiu, Z. y col., 2012. Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Scientific reports*, 2, p.216.
- Radomski, N. y col., 2010. Determination of Genotypic Diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from Human and Animal Origins by Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat and IS1311 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), pp.1026-1034.
- Radomski, N. y col., 2010. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-

- unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *Clin Microbiol*, 48(4).
- Rankin, J.D., 1961. The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. II. Adult cattle inoculated intravenously. *Journal of comparative pathology*, 71, pp.6-9.
- Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C., 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), pp.21-54.
- Romano, M.I. y col., 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Veterinary Microbiology*, 110(3-4), pp.221-237.
- Rosenbusch F., 1937. La enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa del bovino en la Argentina. *Anuales de la Sociedad Rural*, 5, pp.475-480.
- Roussel, A.J. y col., 2007. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6), pp.890-895.
- Rowbotham, D.S. y col., 1995. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut*, 37(5), pp.660-7.
- Rybníček, J., Kramme, S. & Small, P.L., 2006. Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*--application for identification and susceptibility testing. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 1), pp.37-42.
- Sanna, E. y col., 2000. In situ-PCR for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues. *European journal of histochemistry: EJH*, 44(2), pp.179-84.
- Sevilla, I. y col., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC microbiology*, 7, p.18.
- Sevilla, I. x y col., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 24(3), pp.1061-6.

- Sherman, D.M. y col., 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, 51(3), pp.461-5.
- Sherman, D.M., Markham, R.J. & Bates, F., 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(2), pp.179-82.
- Shu, D. y col., 2011. Diverse Cytokine Profile from Mesenteric Lymph Node Cells of Cull Cows Severely Affected with Johne's Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(9), pp.1467-1476.
- Sidoti, F. y col., 2011. Validation and standardization of IS900 and F57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(5), pp.347-354.
- Sigurðardóttir, Ó.G., Valheim, M. & Press, C.M., 2004. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6), pp.819-834.
- Socket, D.C., Carr, D.J. & Collins, M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 56(2), pp.148-53.
- Sohal, J.S. y col., 2013. A new marker IS1311 L2 PCR-REA for identification of «Indian Bison» type *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, pp.204-207.
- Sohal, J.S. y col., 2009. Genomic analysis of local isolate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 134(3-4), pp.375-82.
- Sommer, S. y col., 2009. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), pp.44-52.
- Speer, C.A. y col., 2006. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13(5), pp.535-40.

- Stabel, J., 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 77(3), pp.465-473.
- Stabel, J.R., 2000. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, 61(7), pp.754-60.
- Stabel, J.R. y col., 2011. Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18(7), pp.1139-49.
- Stabel, J.R., Kimura, K. & Robbe-Austerman, S., 2007. Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19(1), pp.43-51.
- Stanley, E.C. y col., 2007. Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), pp.1851-7.
- Stein, R.A. y col., 2011. Super-spreaders in infectious diseases. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 15(8), pp.e510-3.
- Stevenson, K. y col., 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*, 46(1), p.64.
- Stevenson, K. y col., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), pp.1798-804.
- Stevenson, K. y col., 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC microbiology*, 9(1), p.212.
- Stevenson, K. & Sharp, J.M., 1997. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 153(3), pp.269-86.

- Stratmann, J. y col., 2002. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), pp.4244-50.
- Subharat, S. y col., 2012. Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149(3-4), pp.225-236.
- Supply, P. y col., 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular microbiology*, 26(5), pp.991-1003.
- Supply, P. y col., 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*, 36(3), pp.762-71.
- Sweeney, R.W. y col., 1998. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, 59(7), pp.842-7.
- Sweeney, R.W. y col., 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *American journal of veterinary research*, 53(8), pp.1312-4.
- Swift, B.M.C. y col., 2013. Development of a rapid phage-based method for the detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood within 48 h. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), pp.175-179.
- Tanaka, Y. y col., 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature*, 375(6527), pp.155-158.
- Thayer, W.R. y col., 1984. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*, 29(12), pp.1080-5.
- Thibault, V.C. y col., 2008. Combined Multilocus Short-Sequence-Repeat and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), pp.4091-4094.
- Thibault, V.C. y col., 2007. New Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* Strains: Comparison with

- IS900 and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), pp.2404-2410.
- Thorel, M.F. y col., 1997. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Veterinary research*, 28(5), pp.439-47.
- Tirkkonen, T. y col., 2010. Comparison of Variable-Number Tandem-Repeat Markers typing and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), p.21.
- Tizard, I.R., 2013. *Veterinary immunology*, Elsevier/Saunders.
- Tizard, M.L. y col., 1992. p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of general microbiology*, 138 Pt 8, pp.1729-36.
- Travería, G.E. y col., 2013. First identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis* sheep strain in Argentina. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(3), pp.897-9.
- Turenne, C.Y. y col., 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *Journal of bacteriology*, 190(7), pp.2479-87.
- Ubach, F., 1941. Observaciones sobre la enfermedad de Johne y la enteritis coccidiósica de los bovinos, ovinos y caprinos identificadas en la República Argentina. *Rvta Med Vet Bs Aires*, 23, pp.3-45.
- Uhart, M.M. y col., 2003. Health evaluation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. *Journal of wildlife diseases*, 39(4), pp.887-93.
- Urdániz, E. y col., 2016. Rapid Whole-Cell Assay of Antitubercular Drugs Using Second-Generation Fluoromycobacteriophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(5), pp.3253-6.
- Valentin-Weigand, P. & Goethe, R., 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infection*, 1(13), pp.1121-1127.

- Vansnick, E. y col., 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 100(3-4), pp.197-204.
- Vantourout, P. & Hayday, A., 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), pp.88-100.
- Vary, P.H. y col., 1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *Journal of clinical microbiology*, 28(5), pp.933-7.
- Verna, A.E. y col., 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses and public health*, 54(6-7), pp.243-52.
- Vincent Levy-Frebault, V. & Portaels, F., 1992. Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), pp.315-323.
- Waters, W.R. y col., 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infection and immunity*, 71(9), pp.5130-8.
- Waters, W.R. y col., 2016. Interleukin-17A as a Biomarker for Bovine Tuberculosis M. F. Pasetti, ed. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(2), pp.168-180.
- Wells, S.J. y col., 2006. Evaluation of a Rapid Fecal PCR Test for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Dairy Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(10), pp.1125-1130.
- Whipple, D., Kapke, P. & Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 28(11), pp.2561-4.
- Whitlock, R.. y col., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77(3), pp.387-398.
- Whittington, R.J. y col., 1999. Detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Australian veterinary journal*, 77(6), pp.392-7.

- Whittington, R.J., 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), pp.614-22.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., y col., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), pp.3240-8.
- Whittington, R.J. y col., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), pp.2989-3004.
- Whittington, R.J., Fell, S., y col., 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), pp.2550-6.
- Wilson, R.A. y col., 1996. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 53(1-2), pp.49-60.
- Woo, S.R. & Czuprynski, C.J., 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Journal of veterinary science*, 9(1), pp.1-8.
- Ziegler, H.K., Skeen, M.J. & Pearce, K.M., 1994. Role of alpha/beta T and gamma/delta T cells in innate and acquired immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 730, pp.53-70.
- Zurbrick, B.G., Follett, D.M. & Czuprynski, C.J., 1988. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infection and immunity*, 56(7), pp.1692-7.